

**UNIVERSIDAD RICARDO PALMA**

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



**“Evaluación de la genotoxicidad utilizando el ensayo cometa en linfocitos humanos expuestos a diferentes concentraciones de Dimetil Sulfoxido (DMSO)”**

Tesis para optar el Título Profesional de:

**Licenciado en Biología**

Marysabel Colette Salas Sierralta

**Lima, Perú**

**2014**

## *DEDICATORIA*

Dedico esta tesis a mis padres,  
ya que el sentimiento del apoyo  
constante, fue la principal motivación  
que necesité

## AGRADECIMIENTOS

La presente Tesis es un esfuerzo en el cual, directa o indirectamente, participaron varias personas leyendo, opinando, corrigiendo, teniéndome paciencia, dando ánimo, acompañando en los momentos de crisis y en los momentos de felicidad.

Un agradecimiento singular debo al Doctor Jorge Yupanqui Sandoval que, como director de esta tesis, me ha apoyado en mi labor científica; al Magister Mauricio Gonzales Molfino que como asesor me ha orientado y corregido; al Dr. Hugo Gonzales Figueroa por ser el profesor cuyas clases inspiraron mi vocación, con una entrega que sobrepasó, con mucho, todas las expectativas que, como alumna, deposité en su persona y por último pero no menos importante, al profesor Alcides Guerra por haber brindado su apoyo incondicional y haber incitado al trabajo de investigación desde mis primeros ciclos hasta mi tesis.

Gracias también a mis queridos compañeros, que me apoyaron y me permitieron entrar en su vida durante estos casi 7 años de convivir dentro y fuera del salón de clase. José, Giannina y Yat Sen, gracias.

A mi padre que me acompañó en esta aventura que significó la universidad y que, de forma incondicional, entendió mis ausencias y mis malos momentos. A mi madre, que a pesar de la distancia siempre estuvo atenta para saber cómo iba mi proceso. Y a todos mis hermanos, que desde un principio hasta el día hoy siguen dándome ánimo para terminar mis estudios profesionales.

Gracias a todos.

# INDICE

|  |    |
|--|----|
| INDICE .....   | 4  |
| INDICE DE FIGURAS Y TABLAS .....                           | 6  |
| I. INTRODUCCIÓN .....                                      | 9  |
| II. ANTECEDENTES .....                                     | 11 |
| III. OBJETIVOS .....                                       | 15 |
| IV. MATERIALES Y MÉTODOS .....                             | 16 |
| 4.1. Diseño Metodológico .....                             | 16 |
| 4.2. Operacionalización de variables .....                 | 16 |
| 4.3. Procedimiento .....                                   | 17 |
| 4.3.1. Obtención de la muestra.....                        | 17 |
| 4.3.2. Aislamiento de Linfocitos.....                      | 17 |
| 4.3.3. Incubación con DMSO.....                            | 18 |
| 4.3.4. Ensayo cometa.....                                  | 18 |
| 4.4. Técnicas para el procesamiento de la información..... | 22 |
| 4.5. Aspectos éticos.....                                  | 23 |
| V. RESULTADOS.....   | 24 |
| VI. DISCUSION .....  | 46 |
| VII. CONCLUSIONES.....                                     | 50 |
| REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....                            | 52 |
| VIII. ANEXOS.....  | 57 |
| ANEXO 1 .....  | 57 |
| ANEXO 2 .....  | 58 |



# INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

|  |    |
|--|----|
| <i>Fig. 1: Cometa a través del programa COMET ASSAY IV, Clase 2.</i>   | 24 |
| <i>Tabla 1: Estadísticos descriptivos de % de ADN de cabeza y cola con respecto al tiempo.</i>                                     | 25 |
| <i>Tabla 2: Estadísticos descriptivos de % de ADN de cabeza y cola con respecto a la concentración.</i>                            | 26 |
| <i>Tabla 3: Pruebas de normalidad para la variables % de ADN de cabeza y cola</i>  | 28 |
| <i>Tabla 4: Pruebas de normalidad para la variables % de ADN de cabeza y cola</i>  | 28 |
| <i>Fig. 2: Gráficos Q-Q normales de % de ADN en la cabeza con Tiempo</i>   | 29 |
| <i>Fig. 3: Gráficos Q-Q normales de % de ADN en la cola con Tiempo</i>   | 30 |
| <i>Fig. 4: Gráficos Q-Q normales de % de ADN en la cabeza con la Concentración de DMSO</i>   | 31 |
| <i>Fig. 5: Gráficos Q-Q normales de % de ADN en la cola con la concentración de DMSO</i>   | 32 |
| <i>Fig. 6: Gráfico de las medias de % de ADN de cabeza vs la concentración de 10, 7 y 3.5% de DMSO, en 30 y 60 minutos</i>         | 33 |
| <i>Fig. 7: Gráfico de las medias de % de ADN de cola vs la concentración de 10, 7 y 3.5% de DMSO, en 30 y 60 minutos</i>           | 34 |
| <b><i>Tabla 5: Pruebas de los efectos inter-sujetos, % de cabeza y Tiempo</i></b>  | 35 |
| <b><i>Tabla 6: Pruebas de los efectos inter-sujetos, % ADN de cola y Tiempo</i></b>  | 35 |
| <b><i>Tabla 7: DHS de tukey para comparar las concentraciones de 10, 7 y 3.5% de DMSO en el % de ADN de cabeza</i></b>             | 36 |
| <b><i>Tabla 8: DHS de tukey para comparar las concentraciones de 10, 7 y 3.5% de DMSO en el % de ADN de cola</i></b>               | 36 |
| <b><i>Fig. 8: Tendencia de medias de % de ADN de cabeza para las concentraciones de 10, 7 y 3.5% de DMSO a 30 y 60 minutos</i></b> | 37 |
| <b><i>Fig. 9: Tendencia de medias de % de ADN de cola para las concentraciones de 10, 7 y 3.5% de DMSO a 30 y 60 minutos.</i></b>  | 38 |
| <b><i>Tabla 9: Comparaciones múltiples, T de Dunnett del tiempo vs el control</i></b>  | 39 |
| <b><i>Tabla 10: Comparaciones múltiples, T de Dunnett del tiempo vs el control</i></b>   | 39 |
| <b><i>Tabla 12: Pruebas de los efectos inter-sujetos de las variables tiempo y concentración</i></b>                               | 41 |
| <b><i>Tabla 13: Tabla de contingencia Registro visual * Tiempo en minutos</i></b>  | 42 |
| <b><i>Tabla 14: Tabla de contingencia Registro visual * Concentración de DMSO</i></b>  | 42 |
| <b><i>Tabla 15: Pruebas de chi-cuadrado para la variable tiempo</i></b>  | 43 |
| <b><i>Tabla 16: Pruebas de chi-cuadrado para la variable concentración</i></b>   | 43 |
| <b><i>Fig. 10: Media de células según el registro visual, para los 30 y 60 minutos</i></b>   | 44 |
| <b><i>Fig. 11: Media de células según el registro visual, para el control y 10, 7, 3.5% de DMSO.</i></b>                           | 45 |

## RESUMEN

Los agentes genotóxicos son aquellos que en contacto directo con el material nuclear, son capaces de modificar el ADN de las células vivas; el Dimetil Sulfóxido (DMSO) es un líquido orgánico usado como disolvente industrial, medicamento y como criopreservante de células, desde 1940, por su propiedad de atravesar rápidamente la epidermis y membranas celulares. Actualmente el uso de células expuestas a DMSO se ha vuelto tan común, pero muy poco se conoce sobre las posibles consecuencias que este compuesto puede acarrear. Se evaluó la incubación a concentraciones de 10, 7 y 3.5% de DMSO de linfocitos aislados de sangre periférica humana a 30 y 60 minutos, mediante el ensayo cometa. Los resultados no mostraron diferencias significativas en las medias del porcentaje de ADN dañado a 7 y a 3.5%, y a la concentración de 10% de DMSO el daño fue menor; siendo la variable tiempo la única significativa. Es así que los resultados obtenidos nos sugieren que la exposición de células sanguíneas a agentes crioprotectores como el DMSO no conllevaría a un daño significativo en el ADN, pues con el ensayo cometa tanto por registro visual y mediante software se comprobó que a exposiciones prolongadas de 30 y 60 minutos en linfocitos aislados no hubo diferencias significativas en relación a los linfocitos no expuestos.

Palabras clave: Dimetil sulfóxido, DMSO, ensayo cometa, linfocitos.

## ABSTRACT

Genotoxic agents are those able to modify the DNA in direct contact with the nuclear material of living cells. Dimethyl sulfoxide (DMSO) is a liquid organic used as an industrial solvent, cryopreserving agent, and medicine, since 1940, by its property of passing through the epidermis and cell membranes rapidly. Nowadays, the use of cells exposed to DMSO has become so common that too little is known about the potential impact that this compound may cause.

It was evaluated incubations of lymphocytes, isolated of human peripheral blood, at DMSO concentrations of 10, 7 and 3.5% in 30 and 60 minutes, using the comet assay. The results did not showed significant difference in the mean of the damaged DNA in 7 and 3.5% but they weren't lower than the 10% concentration of DMSO, Moreover the time was the only variable significant statistically. Therefore the results obtained suggest that exposure of blood cells to cryoprotectans such as DMSO, did not lead to significant DNA damage, because the comet assay (by visual recording and using the software), proved that prolonged exposure to 30 and 60 minutes of isolated lymphocytes, were not different from non incubated lymphocytes.

Key words: Dimethyl sulfoxide, DMSO, comet assay, lymphocytes.

# I. INTRODUCCIÓN

El DMSO ( $\text{CH}_3\text{SOCH}_3$ ) es un líquido orgánico sin color que contiene sulfóxido, usado como disolvente orgánico industrial a partir de 1940 (Stanley y Robert 1986), como criopreservante a partir de 1961 (Pegg 2007) y como un medicamento (reduce el dolor y la inflamación). Por su propiedad de atravesar rápidamente la epidermis y las membranas celulares el DMSO sirve también como acarreador de drogas o venenos (Jarvis 2011).

Los agentes terapéuticos y tóxicos que no son solubles en agua son a menudo solubles en DMSO. Las propiedades que se consideran particularmente importantes para sus efectos terapéuticos y tóxicos incluyen: su propia penetración rápida (Novak 2002) y una mayor penetración de otras sustancias a través de las membranas biológicas; eliminación de radicales libres; efectos sobre la coagulación; actividad anticolinesterasa inducida por DMSO y la liberación de histamina por los mastocitos (Stanley y Robert 1986). Las combinaciones de DMSO con otros agentes tóxicos, probablemente constituyen su mayor potencial tóxico. La literatura científica ha revisado con especial atención a los mecanismos que subyacen a los efectos terapéuticos y tóxicos registrados de DMSO. Este compuesto simple ha estimulado una gran controversia en la literatura científica y popular (Epstein y Sweat 1967).

Los agentes capaces de ocasionar toxicidad genética son llamados genotóxicos, estas moléculas químicas son capaces de modificar el material hereditario de las células vivas (Monroy *et al.*, 2005). Sin embargo la probabilidad de que una determinada sustancia cause un daño genético depende inevitablemente de diversas variables, como el nivel de exposición del organismo a la sustancia, la distribución y retención de ésta una vez que ha penetrado en el cuerpo, la eficiencia de los sistemas de activación metabólica y/o detoxificación en los tejidos diana y la reactividad de la sustancia o de sus metabolitos con macromoléculas críticas de las células (Holmberg *et al.*, 2001 ).

La estructura y composición de las membranas celulares son muy complejas en todos los tipos de células, es por eso que, entender y aplicar adecuadamente un buen protocolo a un material biológico es fundamental para reducir la muerte celular por el mal manejo de células animales o vegetales. De la misma forma, el uso de sustancias químicas puede conllevar a daños no permisibles al ojo humano (Roy 2000; Ávila *et al.*, 2006).

Uno de los usos del DMSO, y que propulso a la realización de este trabajo fue el de ser uno de los crioprotectores más comerciales a nivel mundial (Torradadella 2002), ya que al ser de un peso molecular muy bajo es permeable a través de la membrana celular, protegiendo así a la célula durante la congelación (Meryman 1971; Fahy 1986; Woods *et al.*, 2004). Actualmente el uso de estas células manipuladas se ha vuelto tan comercial, que se conoce muy poco sobre las posibles consecuencias que este puede atraer. Una disputa muy común entre científicos es tratar de elevar la viabilidad post-descongelación, llegando en algunos casos a elevar las concentraciones de crioprotectores, incrementando la eficacia del método y del mismo modo las consecuencias y síntomas por toxicidad en el hombre (Fahy 1986; Fahy *et al.*, 1990), ya que en el caso de la criopreservación de espermatozoides se observan en la mayoría de casos fragmentación de ADN, porque la toxicidad de estos componentes que actúan como crioprotectores ingresan directamente a la célula y dañan o alteran en cierta medida los cromosomas y por ende el ADN (Domínguez 2010)

Uno de los ensayos que es potencialmente sensible para evidenciar el daño genotóxico que podría ser consecuencia de la criopreservación es el ensayo cometa (Larrea 2007). Existen escasos trabajos sobre la criopreservación de células humanas en el Perú y actualmente es totalmente desconocido si los agentes criopreservantes conllevan a un daño genotóxico a los linfocitos humanos. Es por eso que el presente trabajo propone evaluar dichos posibles efectos de estos agentes crioprotectores teniendo al ensayo cometa como parámetro.

## II. ANTECEDENTES

La genotoxicidad es la capacidad relativa de un agente de ocasionar daño en el material genético, originando efectos biológicos adversos no solo al ADN, sino también a todos aquellos componentes celulares que se encuentren relacionados con la funcionalidad y comportamiento de los cromosomas dentro de la célula (Holmberg *et al.*, 2001 ; Abrevaya 2008).

Los estudios de biomonitorización, intentan establecer la relación entre factores ambientales y enfermedad, detectando alteraciones iniciales en fases todavía no malignas. En el caso de compuestos genotóxicos, la biomonitorización se amplía al uso de los ensayos de genotoxicidad y mutagenicidad, para poder realizar una evaluación del daño a nivel del material genético (Larrea 2007) .

Los ensayos con células humanas han desempeñado un importante papel en la determinación de la toxicidad potencial de los agentes químicos y físicos que rodean al hombre. El modelo celular más usado, son los linfocitos humanos en el biomonitoreo de mezclas biocidas. Muchut *et al.* 2011, evalúa el efecto de pesticidas usados en la agricultura, mediante linfocitos en sangre total; de la misma forma Noris-García *et al.* 2013, evalúa los niveles de plomo en niños con trastornos del espectro autista; de linfocitos aislados. En ambos casos es usado el ensayo cometa o también llamado electroforesis de una célula (Holmberg *et al.*, ; Singh *et al.*, 1988; Collins 2004; Muchut *et al.*, 2011; Garrido *et al.*, 2013; Noris-García *et al.*, 2013)

En los últimos treinta años, se han desarrollado con éxito nuevas metodologías capaces de evaluar el daño en el ADN (Zuñiga 2009). En 1991, el primer estudio de genotoxicidad que utilizó el ensayo cometa evaluó el potencial mutagénico de agentes generados por el tratamiento de permanganato de potasio con soluciones ácidas (De-Meo *et al.*, 1991) , permitiendo hasta la actualidad evaluar los niveles de daño y reparación al ADN en poblaciones celulares, sin la necesidad de trabajar con células en proliferación; siendo este potencialmente sensible para evidenciar el daño

genotóxico inducido (Larrea 2007; Dusinska y Collins 2008). Desde este primer estudio hasta hoy, se han evaluado numerosos compuestos tales como: metales pesados, pesticidas, nitrosaminas, fármacos antineoplásicos, hidrocarburos aromáticos policíclicos, peróxidos, etc (Prósper *et al.*, 2006; Zuñiga 2009).

Los agentes capaces de ocasionar toxicidad genética son llamados genotóxicos, que están constituidos por compuestos químicos de una amplia gama, con efectos múltiples. Para evaluar el daño causado por los potenciales agentes genotóxicos se hace imprescindible el reconocimiento, caracterización, seguimiento de ese efecto y en distintos niveles de análisis; tarea que le compete a una rama de la ciencia interdisciplinaria, la Genética Toxicológica, que se encarga del monitoreo ambiental y humano, por distintos tipos de exposición (Larrea 2007; Abrevaya 2008)

Existen muchos agentes considerados genotóxicos, uno de ellos es el Dimetil Sulfoxido (DMSO), porque penetra la piel rápidamente, es decir a las células (Stanley y Robert 1986), considerado como agente penetrante en la criopreservación que con multimolares concentraciones protegen a la célula del daño que puede ocasionar la congelación lenta (Meryman 1971).

El efecto del DMSO es muy eficiente y eficaz en la criobiología frente a los cambios producidos por la congelación y descongelación, que muy poca atención se ha centrado en los efectos negativos de estos químicos producen. En 1986, Fahy G., se enfoca en la idea de que la toxicidad es el factor clave limitante de los agentes criopreservantes en la criobiología, es decir, para una exitosa congelación sería adecuado aumentar las concentraciones de crioprotector, pero siendo la toxicidad tan alta, solo se puede utilizar el límite aceptado de crioprotector con resultados medianos de viabilidad celular.

Desde que el primer estudio de los efectos bioquímicos de la toxicidad de los crioprotectores fue reportado por exposición de tejido renal a altas concentraciones de Dimetil Sulfoxido, 37% DMSO (Baxter y Lathe 1971), se han investigado moléculas capaces de bloquear componentes para reducir la toxicidad insatisfactoriamente en algunos casos (Fahy *et al.*, 1990), del mismo modo

protocolos que reducen la cantidad máxima tolerada de agentes crioprotectores para tener una exitosa criopreservación, siendo, esta última estandarizada, y potencialmente usada a nivel mundial en sangre de cordón umbilical, con una concentración final de DMSO y Dextrano 40 al 10% (Rubinstein *et al.*, 1995).

A partir de este último reporte, se han descrito muchos otros métodos que comparan la efectividad, por ejemplo; la criopreservación de células progenitoras usando DMSO al 5% (Galmes *et al.*, 1999); células madre de sangre periférica a 6% de hidroxietilalmidón (HES) y DMSO 5% sin congelación a velocidad controlada (Katayama *et al.*, 1997); células CD34+ purificados a partir de sangre periférica y congelados en DMSO al 7.5% para fines de trasplante (Beaujea *et al.*, 1998); células progenitoras de médula ósea congeladas a 1% de albumina de suero humano, HES al 2.5% y DMSO al 3.5% (Halle *et al.*, 2001), células progenitoras de médula ósea con DMSO al 10% y Trehalosa 0.25M (Scheinkönig *et al.*, 2004), etc; teniendo como uno de los parámetros en común de evaluación, la viabilidad celular por métodos de tinción a microscopio óptico, fluorescencia, o por citometría de flujo. En todos los casos no hubo diferencias significativas con respecto a las concentraciones del DMSO, pero sí, en algunos casos el protocolo es considerado más sencillo, menos costoso y que puede producir éxito del injerto (en el caso de Trasplante celular), comparable a la obtenida con el procedimiento de almacenamiento estándar (Rubinstein *et al.*, 1995).

Dimetil Sulfoxido es uno de los agentes crioprotectores más usados en el campo médico, para congelar células progenitoras hematopoyéticas de médula ósea o sangre periférica (Epstein y Sweat 1967; Hubel 1997; Roy 2000; Jarvis 2011). Recientes estudios sugieren que existe una toxicidad neurológica asociada a este crioprotector, con síntomas como, palidez cutánea, pérdida de conciencia e hipoxia, luego del trasplante autólogo de células madre criopreservadas en DMSO al 10% (1g/kg) ; observados en pacientes con mieloma múltiple (Abdelkefi *et al.*, 2009). Del mismo modo, Júnior *et al.* informó de un caso similar con una dosis reducida de DMSO (0,3 g / kg), lo que sugiere que la toxicidad de DMSO también puede ser idiosincrásica, y por lo tanto, es impredecible e inevitable (Júnior *et al.*, 2007).

La integridad de nuestro ADN es un aspecto fundamental para la salud y el buen funcionamiento de nuestro organismo. Sin embargo, sabemos que el material genético es susceptible a ser dañado por numerosos agentes y/o procesos; así, por ejemplo el daño del ADN de los espermatozoides de mamíferos se considera como una causa importante de infertilidad y ha despertado particular interés debido al riesgo que implica la transmisión de defectos genéticos a la descendencia (Domínguez 2010). Estos daños pueden ser evaluados mediante el ensayo cometa (Comet assay).

Es por eso que entender y aplicar adecuadamente la criopreservación a un material biológico es fundamental en laboratorios y bancos de células.

### III. OBJETIVOS

#### **General**

Evaluar la genotoxicidad utilizando el ensayo cometa en linfocitos humanos expuestos a diferentes concentraciones de Dimetil Sulfoxido (DMSO).

#### **Específicos**

Aislar linfocitos de sangre periférica humana.

Incubar los linfocitos aislados, en concentraciones de 10, 7 y 3.5% de DMSO a 0, 30 y 60 minutos.

Establecer el daño primario de los linfocitos incubados, a través del ensayo cometa.

Determinar la asociación entre el DMSO y el daño genotóxico.

## IV. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1. Diseño Metodológico

Experimental, Prospectivo, Longitudinal.

### 4.2. Operacionalización de variables

| VARIABLE                       | ESCALA                               | INSTRUMENTO         | UNIDAD DE ANALISIS | DEFINICIÓN   |
|--------------------------------|--------------------------------------|---------------------|--------------------|--|
| Intensidad de ADN en la cabeza | Cuantitativas, de proporción o razón | Comet assay IV      | Linfocitos humanos | Medida de la intensidad de la coloración de la cabeza en % |
| Intensidad de ADN en la cola   | Cuantitativas, de proporción o razón | Comet assay IV      | Linfocitos humanos | Medida de la intensidad de la coloración de la cola en %   |
| Registro visual de daño        | Cualitativa, ordinal                 | Microscopio, visual | Linfocitos humanos | Registro del tamaño de la cometa en escala del 1 al 4.     |
| Concentración de DMSO          | Cualitativa, ordinal                 | -                   | Linfocitos humanos | Concentración de 10, 7 y 3.5% de DMSO                      |
| Tiempo                         | Cualitativa, ordinal                 | Reloj               | Linfocitos humanos | Tiempo de incubación, de 30 y 60 minutos                   |

## **4.3. Procedimiento**

### **4.3.1. Obtención de la muestra**

Se recolectó sangre periférica mediante punción intravenosa a estudiantes voluntarios de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Ricardo Palma, durante Mayo a Junio del presente año, a los cuales se les informó del motivo de recolección de sangre mediante un consentimiento informado (ver Anexo 1). Una vez dada la autorización se extrajo 5 mL de sangre que fue almacenada en un tubo de Heparina sódica, para su uso inmediato. El número de personas a muestreadas fue de 30.

### **4.3.2. Aislamiento de Linfocitos**

Una vez recolectada la muestra se procedió al aislamiento de linfocitos, colocando la solución aisladora de linfocitos (Lymphocyte separation médium 1077, PAA) y lentamente con una pipeta Pasteur se colocó la sangre colectada en tubos Falcon de 25 mL, en proporción de 1:1 evitando la mezcla de las dos fases. Se centrifugó a  $6,425 \times g$  por 15 minutos. Recuperando cuidadosamente la capa de linfocitos que se encontró sobre el medio de aislamiento y bajo el plasma y trombocitos (PAA 2013).

Lavado de linfocitos:

se recolectó aproximadamente 2mL en un tubo (Eppendorf 2.5mL) y se centrifugó por 5 minutos

Se desechó el sobrenadante (1.7mL) y se aforó a 2mL con suero fisiológico a temperatura ambiente.

Se repitió 3 veces el ultimo protocolo hasta la total eliminación de la solución aisladora de linfocitos, para su posterior uso (Anderson *et al.*, 2013).

### **4.3.3. Incubación con DMSO**

La incubación fue realizada en tubos (Eppendorf 2.5 mL) y se utilizó como medio RPMI (RPMI 1640 Gibco).

En cada Eppendorf se colocó 500µL de medio, 50µL de linfocitos aislados y a cada uno de los tubos se le agregó DMSO (J.T.Baker® Dimethyl Sulfoxide) en las proporciones correctas para 10, 7 y 3.5%, durante 0, 30 y 60 minutos en una incubadora de CO<sub>2</sub>.

Luego de culminar el tiempo de incubación se retiró los tubos eppendorf y se centrifugó con el fin de separar nuevamente las células, de las cuales se utilizaron 5ul del pellet para el ensayo cometa.

### **4.3.4. Ensayo cometa**

En su versión estándar el ensayo se lleva a cabo en condiciones alcalinas de acuerdo con el método inicialmente descrito por Singh *et al.* (Singh *et al.*, 1988), con ligeras modificaciones. Este protocolo supone la realización de diversas etapas tal como se describe a continuación: (Zuñiga 2009).

#### **4.3.4.1. Preparación de los microgeles de agarosa**

Para la realización del ensayo, se utilizó portaobjetos preferentemente esmerilados (Single frosted microscope slides), previamente cubiertos con 100uL de agarosa de punto de fusión normal (NMA) al 1% disuelta en agua bidestilada y deshidratada a 60°C durante una hora.

Tabla 1: Reactivos y cantidades para la preparación de Agarosa de normal punto de fusión

| REACTIVOS                         | CANTIDAD |
|-----------------------------------|----------|
| Agarosa de normal punto de fusión | 0.5 g    |
| Agua bidestilada o PBS            | 50mL     |

Antes de realizar la primera capa, los portaobjetos deben estar muy limpios y secos, preferentemente hervidos en detergente y desengrasados con etanol. Se prepararon alícuotas con aproximadamente 40.000 células, cada alícuota se mezcló con 80 uL de agarosa de bajo punto de fusión (LMA) al 0.5%, mantenido previamente a 37°C (5uL en 80uL de agar para soluciones puras de linfocitos).

Tabla 2: Reactivos y cantidades para la preparación de Agarosa de bajo punto de fusión

| REACTIVOS                       | CANTIDAD |
|---------------------------------|----------|
| Agarosa de bajo punto de fusión | 0.125 g  |
| Agua bidestilada o PBS          | 25mL     |

Esta mezcla celular se depositó sobre los porta objetos previamente preparados y debidamente rotulados e, inmediatamente, se cubrieron con un cubre objetos de 25x75 mm. Se dejó solidificar a 4°C durante 15 min y, trascurrido este tiempo se

retiró los cubreobjetos, procurando no perturbar las capas. Posteriormente, se dejó aclimatar el porta objeto a medio ambiente y luego se depositó una tercera capa de agarosa (LMA) en agua bidestilada sobre la capa celular, se cubrió nuevamente con un cubreobjetos de la misma medida y se dejó solidificar también por 15 minutos a 4°C.

A continuación, se retiraron los cubreobjetos y las preparaciones fueron sumergidas en el tampón de lisis que se describe a continuación:

#### 4.3.4.2. Lisis de membranas celulares

La solución de Stock de lisis estuvo compuesta de:

Tabla 3: Reactivos y cantidades para la preparación de la solución lisis stock.

| REACTIVOS                   | CANTIDAD         |
|-----------------------------|------------------|
| NaCl 2.5M                   | 146.1g           |
| Na <sub>2</sub> EDTA 100 mM | 37.2 g           |
| Tris – HCl 10 mM            | 1.2g             |
| Agua desionizada estéril    | Aforar a 1000 mL |

Se ajustó a pH 10 con con NaOH o HCl.

La solución de lisis final estuvo compuesta de:

Tabla 4: Reactivos y cantidades para la preparación de la solución de lisis final

| REACTIVOS               | CANTIDAD |
|-------------------------|----------|
| Solución de lisis stock | 40mL     |
| Triton X-100            | 400uL    |
| DMSO                    | 4mL      |

Se preparó antes de usar, y mantuvo en una cubeta opaca a 4°C para asegurar la estabilidad de los geles en los portaobjetos,

Las preparaciones fueron sumergidas entre 1 y 24 h, a 4°C.

A partir de este punto, todo el proceso se realizó en oscuridad para evitar el daño adicional que podría producir la luz en el ADN desprotegido.

#### **4.3.4.3. Desnaturalización y electroforesis**

Tras la lisis, las preparaciones se colocaron en un tanque de electroforesis horizontal evitando espacios entre ellas; en caso de no abarcar toda la superficie disponible de la cubeta de electroforesis con las preparaciones, se llenó con portaobjetos para asegurar la uniformidad en el paso de la corriente durante la electroforesis e impedir el movimiento de las preparaciones sometidas al campo eléctrico. Se llenaron las cubetas con tampón de electroforesis de manera que las preparaciones queden completamente sumergidas en él y se dejaron en estas condiciones durante 20 min para que ocurra la fase de desenrollamiento. Transcurrido este tiempo, se procedió a una electroforesis durante 20 min a 25 V y a 300mA. Se procuró establecer una orientación de las preparaciones teniendo en cuenta que el ADN, al tener carga negativa, migrará hacia el polo positivo.

Tabla 5: Reactivos y cantidades para la preparación del buffer de electroforesis

| REACTIVOS                | CANTIDAD |
|--------------------------|----------|
| Na <sub>2</sub> EDTA 1nM | 0.7445   |
| NaOH 300mM               | 40 g     |
| Agua desionizada         | 1000 mL  |

La alcalinidad de pH > 13, permitió la disociación de las hebras de ADN

#### **4.3.4.4. Neutralización**

Una vez finalizada la electroforesis, los portaobjetos se retiraron con cuidado de la cubeta y se colocaron en un coplin para someterlos al buffer de neutralización durante 5 minutos.

Tabla 6: Reactivos y cantidades para la preparación del buffer de neutralización

| REACTIVOS        | CANTIDAD |
|------------------|----------|
| Triz – HCl 0.4mM | 48.5 g   |
| Agua desionizada | 1000 mL  |

Se ajustó el pH a 7.5 con HCL o NaOH y conservó a 8°C.

#### **4.3.4.5. Deshidratación**

Tras la neutralización, las preparaciones se deshidrataron depositando en la superficie de cada una de ellas 2mL de etanol durante 3 minutos. La deshidratación con alcohol (metanol absoluto o alcohol) permitió almacenar los portaobjetos durante un tiempo antes de su recuento. Las preparaciones se guardaron en cajas oscuras para evitar la luz directa y a temperatura ambiente.

#### **4.3.4.6. Tinción y visualización**

Las preparaciones se tiñeron justo antes del análisis microscópico. Para esto se depositó 60uL de bromuro de etidio a una concentración de 0.4ug/mL sobre cada una de las preparaciones, y se cubrieron con un cubreobjetos de 24 x 60 mm.

La visualización se realizó utilizando un microscopio de fluorescencia, equipado con filtro de excitación de 480-550 nm (Larrea 2007; Zuñiga 2009).

### **4.4. Técnicas para el procesamiento de la información**

La evaluación de genotoxicidad fue desarrollada por observación de las láminas en microscopio de fluorescencia, usando el programa COMET ASSAY IV, el cual posee una cámara conectada al microscopio permitiendo la calificación de las células rápidamente y toda la información fue almacenada automáticamente en Excel para el

posterior análisis estadística, además de un análisis de registro visual, categorizando el daño de la célula en una escala del 1 al 4, según Speit y Hartmann 1995; Collins 2004; Larrea 2007 (ver Anexo 2).

El análisis se realizó mediante el paquete estadístico SPSS 22, donde se hizo un análisis de descriptivos de todas las variables. Se hizo la prueba de Kolmogorov-Smirnov para evaluar la normalidad de los datos, ANOVA de dos vías para analizar la dependencia de variables, DHS de Tukey para comparar las diferencias entre las medias marginales de las diferentes concentraciones, prueba de Dunnet para evaluar si los datos son estadísticamente diferentes al control, un análisis multivariado de variables (MANOVA) para evaluar la dependencia de los factores y finalmente la prueba de Chi cuadrado para evaluar la dependencia de los resultados cualitativos con respecto a las variables tiempo y concentración.

El valor de  $p \leq 0.05$ , se consideró como nivel estadísticamente significativo.

#### **4.5. Aspectos éticos**

No se incluyen los nombres de los pacientes, ni sus iniciales, ni los números que les haya sido asignados en el consentimiento informado.

## V. RESULTADOS

Los resultados incluyen el análisis descriptivo y analítico para la evaluación del daño genotóxico por el ensayo cometa (software y registro visual) expuestos a DMSO a diferentes concentraciones.

El efecto genotóxico fue evaluado a través del ensayo del cometa (Fig. 1)

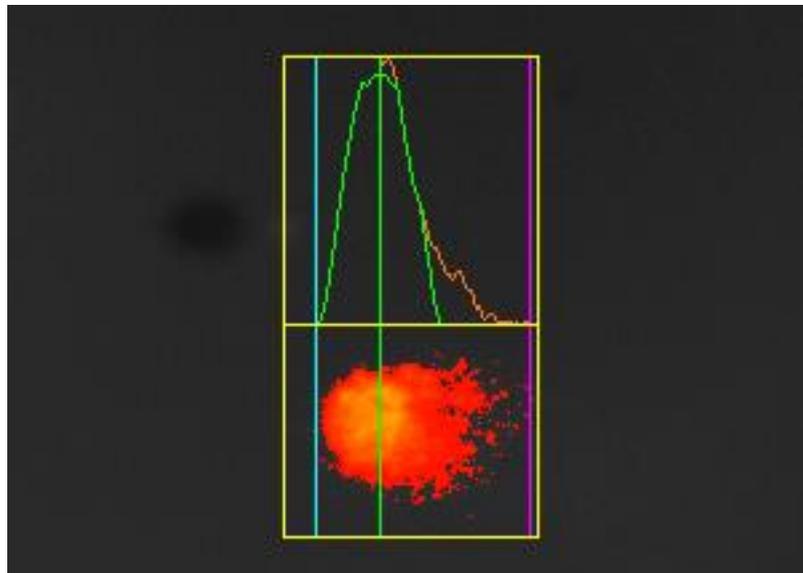


Fig. 1: Cometa a través del programa COMET ASSAY IV, Clase 2.

El cuadro amarillo indica el área de la cometa, la línea celeste el comienzo de la cabeza, la línea verde el centro de la célula, la línea purpura indica el final de la cometa.

La media de los datos del ensayo cometa analizados por el software se observan en la Tabla 1 y 2. En las cuales los linfocitos que presentaron un mayor daño, es decir, un porcentaje de ADN en cola menor fue en a los 60 minutos en general, con una media de 30.801%, seguida de un 21.331% a los 30 minutos con respecto al tiempo. Por otro lado la media en los controles fueron de 7.85%(Control negativo) y 69.262%

(Control positivo con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) con respecto al tiempo. No hubo diferencias grandes entre las medias de % de ADN de cola con respecto a las diferentes concentraciones de 10, 7 y 3.5%, con resultados de 25.026, 26.44 y 26.455 %.

Tabla 1: Estadísticos descriptivos de % de ADN de cabeza y cola con respecto al tiempo.

|                       | Tiempo en minutos                           |   | Estadístico     |        |
|-----------------------|---|---|-----------------|--------|
| % de ADN en la Cabeza | 0 minutos                                   | Media                                       | 92,148          |        |
|                       |   | Intervalo de confianza para la media al 95% | Límite inferior | 90,624 |
|                       |   |   | Límite superior | 93,671 |
|                       |   | Mediana                                     | 93,264          |        |
|                       |   | Mínimo                                      | 83,877          |        |
|                       | Máximo                                      | 98,038                                      |                 |        |
|                       | Con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>           | Media                                       | 30,737          |        |
|                       |   | Intervalo de confianza para la media al 95% | Límite inferior | 23,624 |
|                       |   |   | Límite superior | 37,851 |
|                       |   | Mediana                                     | 28,958          |        |
|                       |   | Mínimo                                      | 1,706           |        |
|                       | Máximo                                      | 95,047                                      |                 |        |
|                       | 30 minutos                                  | Media                                       | 78,668          |        |
|                       |   | Intervalo de confianza para la media al 95% | Límite inferior | 75,849 |
|                       |   |   | Límite superior | 81,488 |
| Mediana               |   | 81,015                                      |                 |        |
| Mínimo                |   | 20,569                                      |                 |        |
| Máximo                | 99,516                                      |   |                 |        |
| 60 minutos            | Media                                       | 69,198                                      |                 |        |
|                       | Intervalo de confianza para la media al 95% | Límite inferior                             | 67,320          |        |
|                       |   | Límite superior                             | 71,076          |        |
|                       | Mediana                                     | 69,903                                      |                 |        |
|                       | Mínimo                                      | 50,540                                      |                 |        |
| Máximo                | 87,629                                      |   |                 |        |
| % de ADN en la cola   | 0 minutos                                   | Media                                       | 7,851           |        |
|                       |   | Intervalo de confianza para la media al 95% | Límite inferior | 6,328  |
|                       |   |   | Límite superior | 9,375  |
|                       |   | Mediana                                     | 6,735           |        |
|                       |   | Mínimo                                      | 1,961           |        |
|                       | Máximo                                      | 16,122                                      |                 |        |
|                       | Con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>           | Media                                       | 69,262          |        |
|                       |   | Intervalo de confianza para la media al 95% | Límite inferior | 62,148 |
|                       |   |   | Límite superior | 76,375 |
|                       |   | Mediana                                     | 71,041          |        |
|                       |   | Mínimo                                      | 4,952           |        |
|                       | Máximo                                      | 98,293                                      |                 |        |

|            |   |                 |         |
|------------|---|-----------------|---------|
| 30 minutos | Media                                       |                 | 21,331  |
|            | Intervalo de confianza para la media al 95% | Límite inferior | 18,511  |
|            |   | Límite superior | 24,1508 |
|            | Mediana                                     |                 | 18,984  |
|            | Mínimo                                      |                 | ,483    |
|            | Máximo                                      |                 | 79,430  |
| 60 minutos | Media                                       |                 | 30,801  |
|            | Intervalo de confianza para la media al 95% | Límite inferior | 28,923  |
|            |   | Límite superior | 32,679  |
|            | Mediana                                     |                 | 30,096  |
|            | Mínimo                                      |                 | 12,370  |
|            | Máximo                                      |                 | 49,459  |

Tabla 2: Estadísticos descriptivos de % de ADN de cabeza y cola con respecto a la concentración.

|                       | Concentración de DMSO                              |   | Estadístico     |        |
|-----------------------|--|---|-----------------|--------|
| % de ADN en la Cabeza | Control negativo 0% de DMSO                        | Media                                       |                 | 92,148 |
|                       |  | Intervalo de confianza para la media al 95% | Límite inferior | 90,624 |
|                       |  |   | Límite superior | 93,671 |
|                       |  | Mediana                                     |                 | 93,264 |
|                       |  | Mínimo                                      |                 | 83,877 |
|                       |  | Máximo                                      |                 | 98,038 |
|                       | Control positivo con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | Media                                       |                 | 28,594 |
|                       |  | Intervalo de confianza para la media al 95% | Límite inferior | 22,788 |
|                       |  |   | Límite superior | 34,399 |
|                       |  | Mediana                                     |                 | 28,814 |
|                       |  | Mínimo                                      |                 | 1,706  |
|                       |  | Máximo                                      |                 | 94,516 |
|                       | DMSO 10%   | Media                                       |                 | 74,973 |
|                       |  | Intervalo de confianza para la media al 95% | Límite inferior | 72,294 |
|                       |  |   | Límite superior | 77,653 |
|                       |  | Mediana                                     |                 | 75,860 |
|                       |  | Mínimo                                      |                 | 50,009 |
|                       |  | Máximo                                      |                 | 95,047 |
|                       | DSMO 7%  | Media                                       |                 | 73,555 |
|                       |  | Intervalo de confianza para la media al 95% | Límite inferior | 69,830 |
|                       |  |   | Límite superior | 77,281 |
|                       |  | Mediana                                     |                 | 74,476 |
|                       |  | Mínimo                                      |                 | 20,569 |
|                       |  | Máximo                                      |                 | 96,824 |
| DMSO 3.5%             | Media  |   | 73,544          |        |
|                       | Intervalo de confianza para la media al 95%        | Límite inferior                             | 70,412          |        |
|                       |  | Límite superior                             | 76,677          |        |
|                       | Mediana  |   | 72,068          |        |
|                       | Mínimo   |   | 50,540          |        |
|                       | Máximo   |   | 99,516          |        |

|                     |   |   |                 |        |
|---------------------|---|---|-----------------|--------|
| % de ADN en la cola | Control negativo 0% de DMSO                 | Media                                       |                 | 7,851  |
|                     |   | Intervalo de confianza para la media al 95% | Límite inferior | 6,328  |
|                     |   |   | Límite superior | 9,375  |
|                     |   | Mediana                                     |                 | 6,735  |
|                     |   | Mínimo                                      |                 | 1,961  |
|                     |   | Máximo                                      |                 | 16,122 |
|                     | Control positivo con H2O2                   | Media                                       |                 | 71,405 |
|                     |   | Intervalo de confianza para la media al 95% | Límite inferior | 65,600 |
|                     |   |   | Límite superior | 77,211 |
|                     |   | Mediana                                     |                 | 71,185 |
|                     |   | Mínimo                                      |                 | 5,483  |
|                     |   | Máximo                                      |                 | 98,293 |
|                     | DMSO 10%                                    | Media                                       |                 | 25,026 |
|                     |   | Intervalo de confianza para la media al 95% | Límite inferior | 22,346 |
|                     |   |   | Límite superior | 27,705 |
|                     |   | Mediana                                     |                 | 24,139 |
|                     |   | Mínimo                                      |                 | 4,952  |
|                     |   | Máximo                                      |                 | 49,990 |
|                     | DSMO 7%                                     | Media                                       |                 | 26,444 |
|                     |   | Intervalo de confianza para la media al 95% | Límite inferior | 22,718 |
| Límite superior     |   |   | 30,169          |        |
| Mediana             |   | 25,523                                      |                 |        |
| Mínimo              |   | 3,175                                       |                 |        |
| Máximo              |   | 79,430                                      |                 |        |
| DMSO 3.5%           | Media                                       |   | 26,455          |        |
|                     | Intervalo de confianza para la media al 95% | Límite inferior                             | 23,322          |        |
|                     |   | Límite superior                             | 29,587          |        |
|                     | Mediana                                     |   | 27,931          |        |
|                     | Mínimo                                      |   | ,483            |        |
|                     | Máximo                                      |   | 49,459          |        |

Se hizo una prueba de Kolmogorov-Smirnov para evaluar la normalidad de los datos, con las variables tiempo y concentración respecto al porcentaje de cabeza y de cola (Tabla 3 y 4). Los expuestos mostraron incremento estadísticamente significativo ( $p < 0.05$ ) y los datos fueron normales con respecto al tiempo y la concentración. El resultado fue corroborado con la prueba gráfica del Q-Q, indicando la normalidad de los datos en el porcentaje de ADN de cabeza y de la cola con respecto al tiempo y concentración de ADN (Fig. 2, 3, 4, 5).

Tabla 3: Pruebas de normalidad para la variables % de ADN de cabeza y cola

|                       | Tiempo en minutos | Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup> |    |       |
|-----------------------|-------------------|---------------------------------|----|-------|
|                       |                   | Estadístico                     | gl | Sig.  |
| % de ADN en la Cabeza | 0 minutos         | ,155                            | 30 | ,064  |
|                       | Con H2O2          | ,268                            | 31 | ,000  |
|                       | 30 minutos        | ,088                            | 89 | ,088  |
|                       | 60 minutos        | ,065                            | 90 | ,200* |
| % de ADN en la cola   | 0 minutos         | ,155                            | 30 | ,064  |
|                       | Con H2O2          | ,268                            | 31 | ,000  |
|                       | 30 minutos        | ,088                            | 89 | ,088  |
|                       | 60 minutos        | ,065                            | 90 | ,200* |

\*. Este es un límite inferior de la significación verdadera.

a. Corrección de la significación de Lilliefors

Tabla 4: Pruebas de normalidad para la variables % de ADN de cabeza y cola

|                       | Concentracion de DMSO       | Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup> |    |       |
|-----------------------|-----------------------------|---------------------------------|----|-------|
|                       |                             | Estadístico                     | gl | Sig.  |
| % de ADN en la Cabeza | Control negativo 0% de DMSO | ,155                            | 30 | ,064  |
|                       | DMSO 10%                    | ,053                            | 60 | ,200* |
|                       | DSMO 7%                     | ,073                            | 60 | ,200* |
|                       | DMSO 3.5%                   | ,087                            | 60 | ,200* |
| % de ADN en la cola   | Control negativo 0% de DMSO | ,155                            | 30 | ,064  |
|                       | DMSO 10%                    | ,053                            | 60 | ,200* |
|                       | DSMO 7%                     | ,073                            | 60 | ,200* |
|                       | DMSO 3.5%                   | ,087                            | 60 | ,200* |

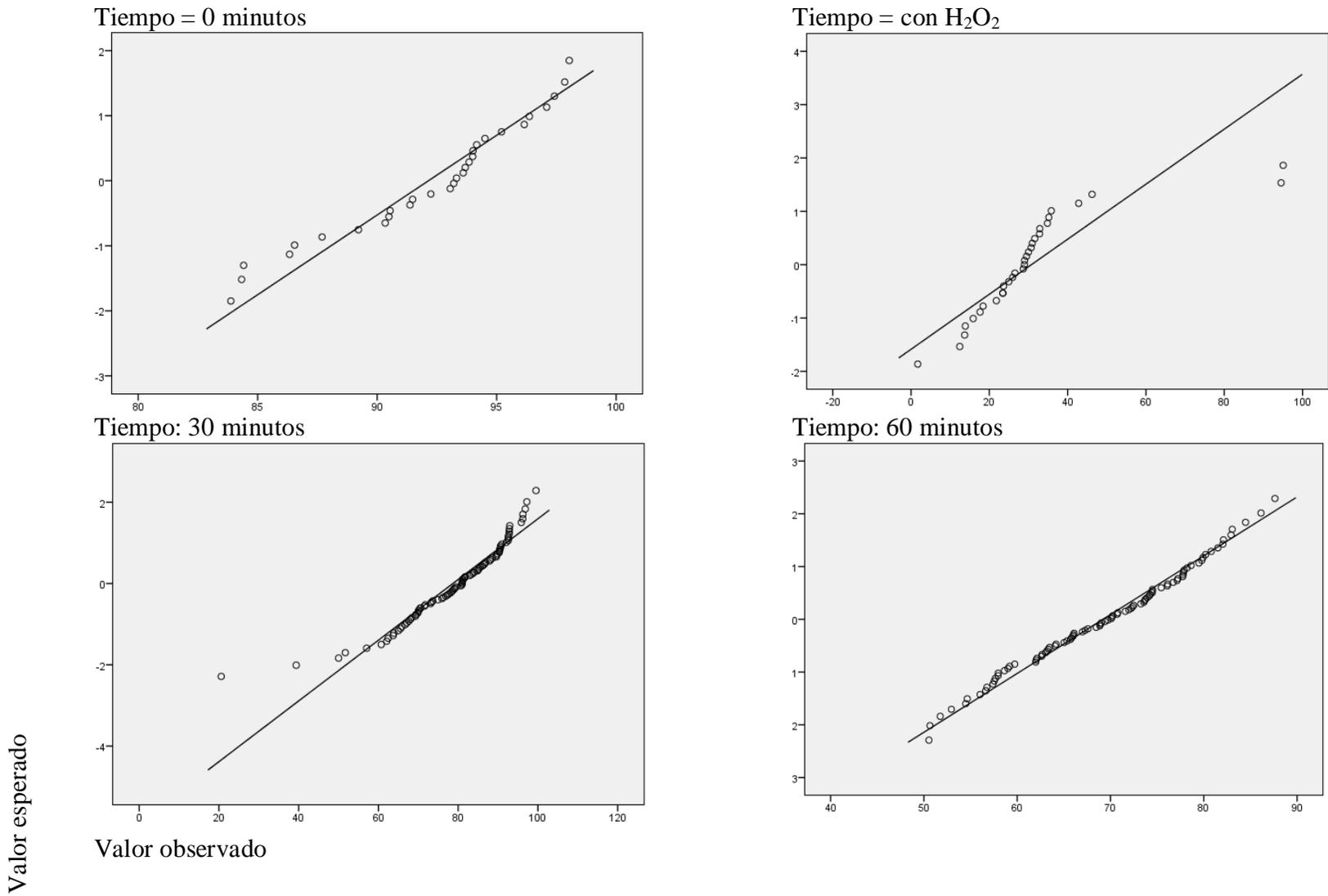


Fig. 2: Gráficos Q-Q normales de % de ADN en la cabeza con Tiempo

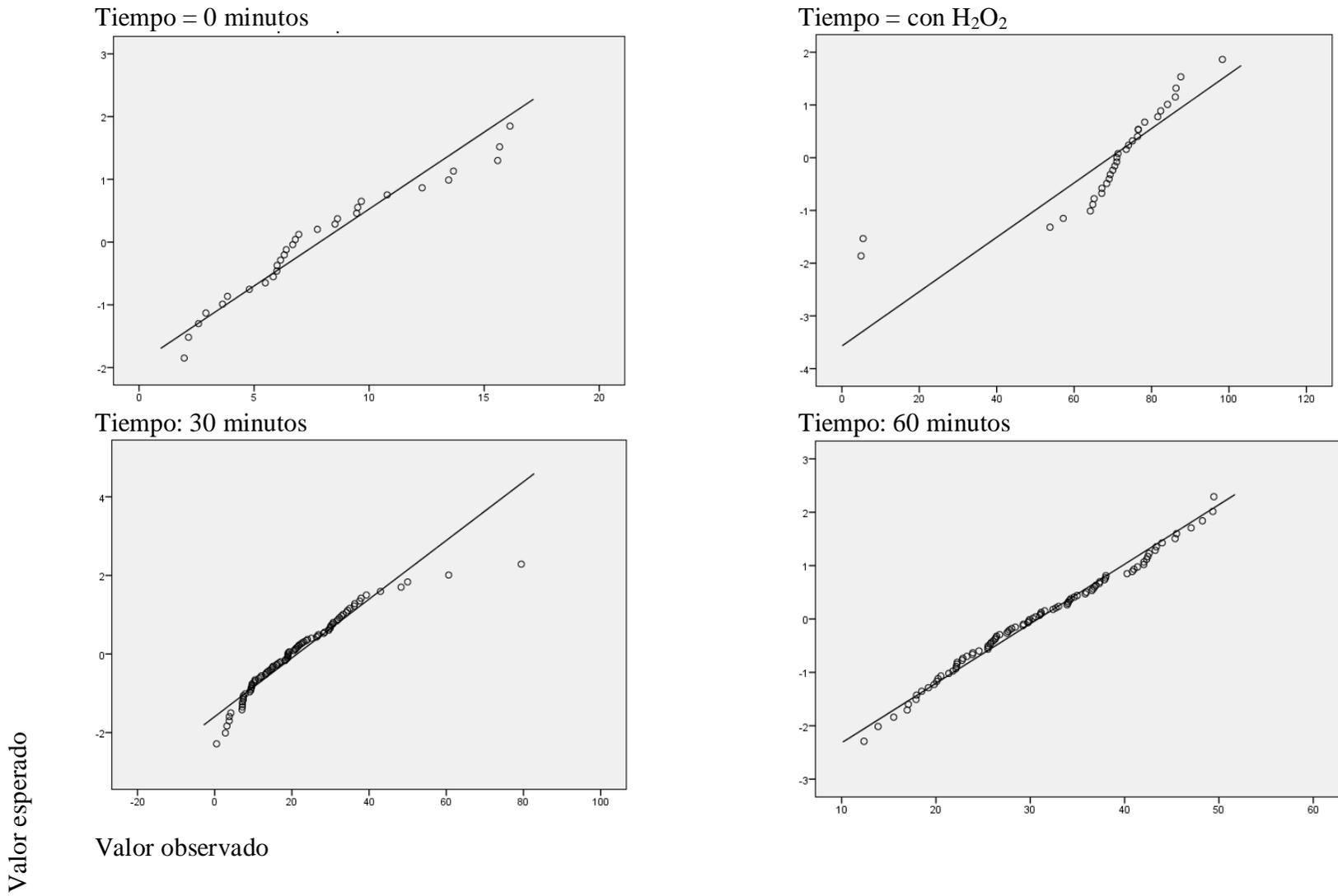


Fig. 3: Gráficos Q-Q normales de % de ADN en la cola con Tiempo

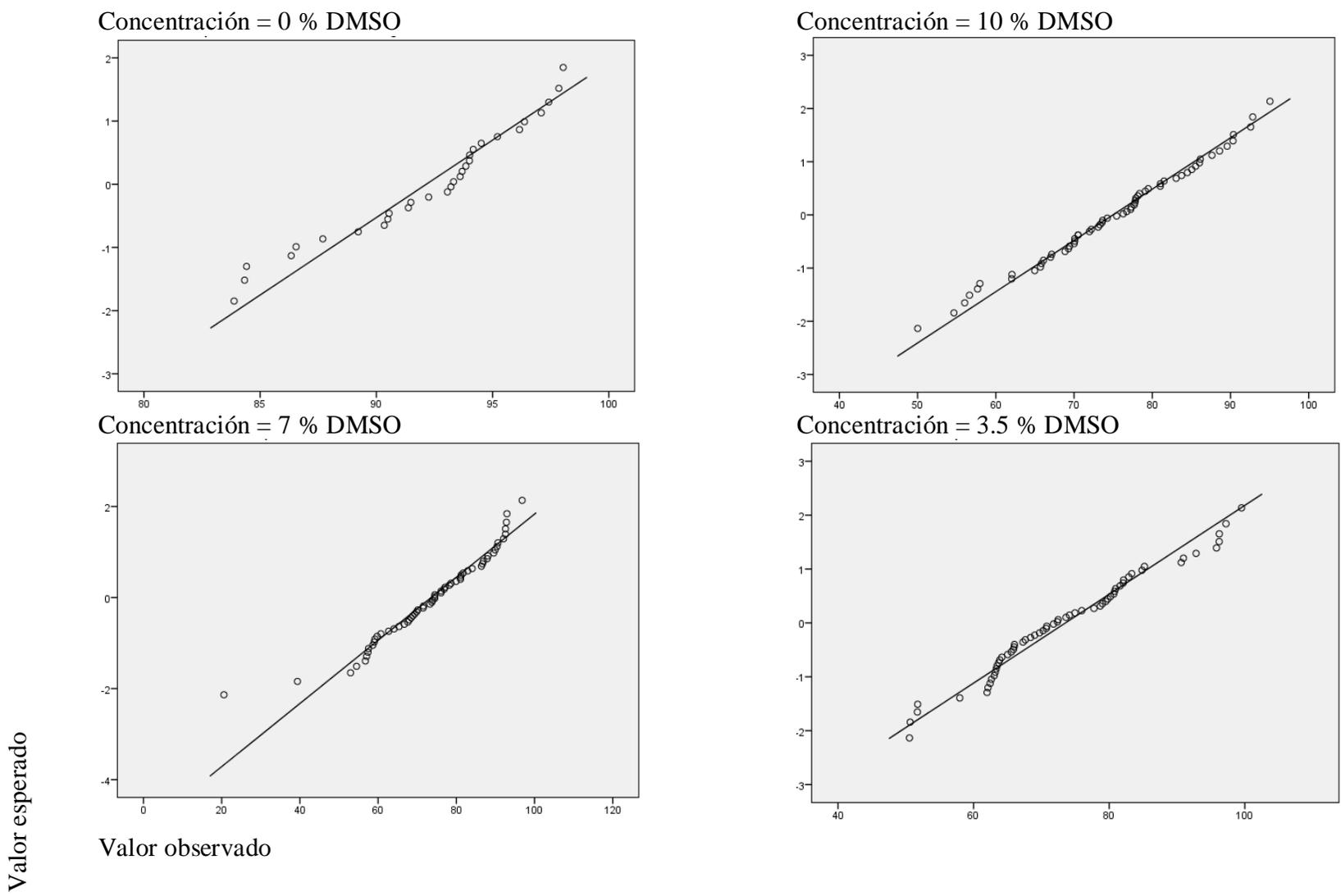


Fig. 4: Gráficos Q-Q normales de % de ADN en la cabeza con la Concentración de DMSO

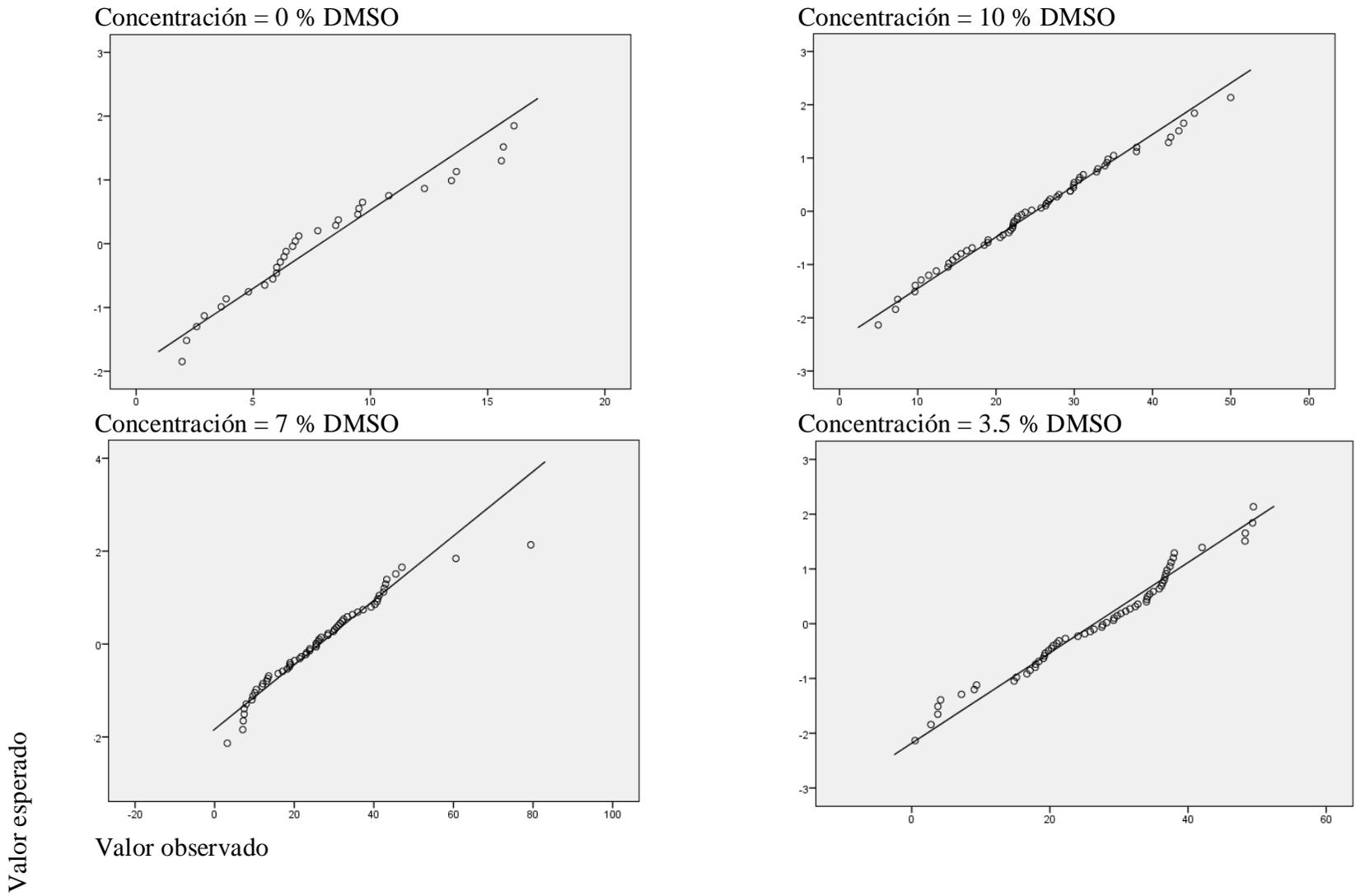


Fig. 5: Gráficos Q-Q normales de % de ADN en la cola con la concentración de DMSO

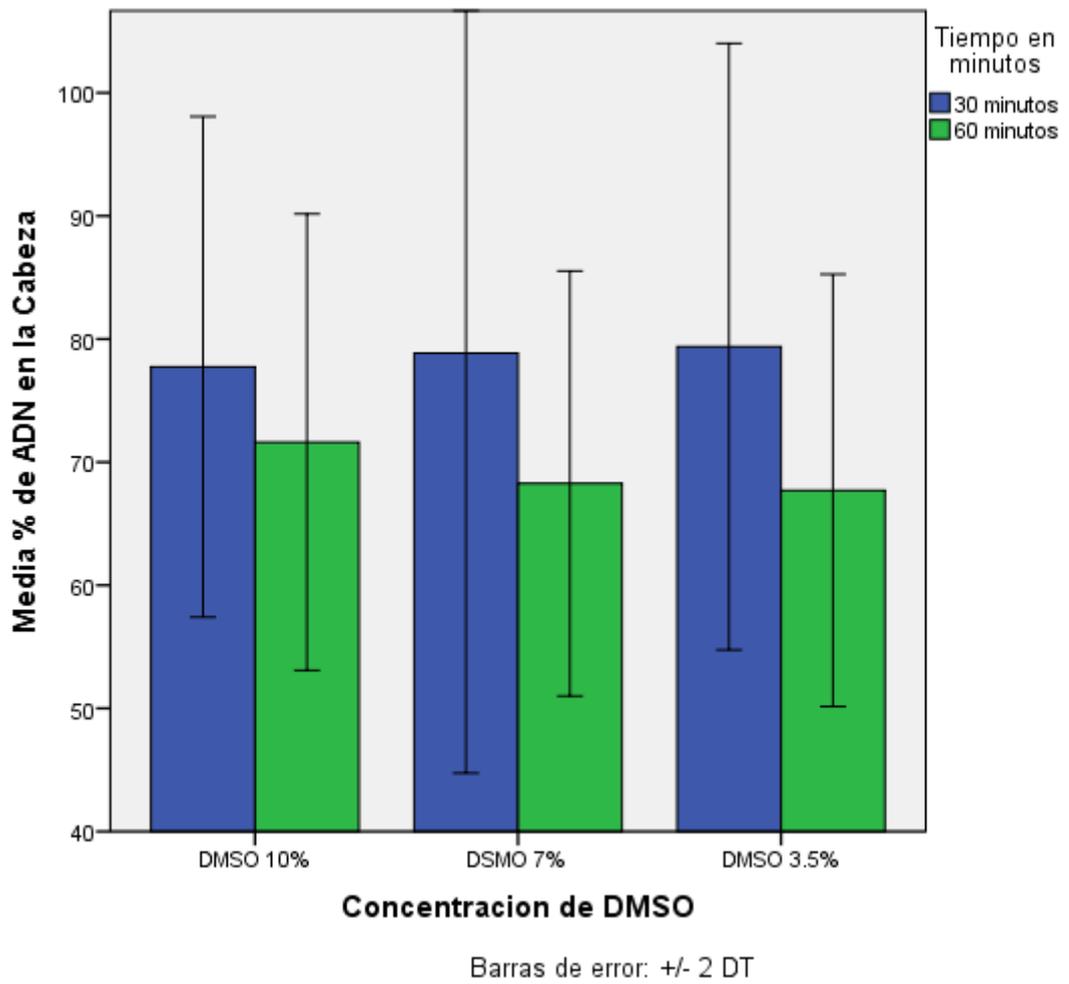


Fig. 6: Gráfico de las medias de % de ADN de cabeza vs la concentración de 10, 7 y 3.5% de DMSO, en 30 y 60 minutos

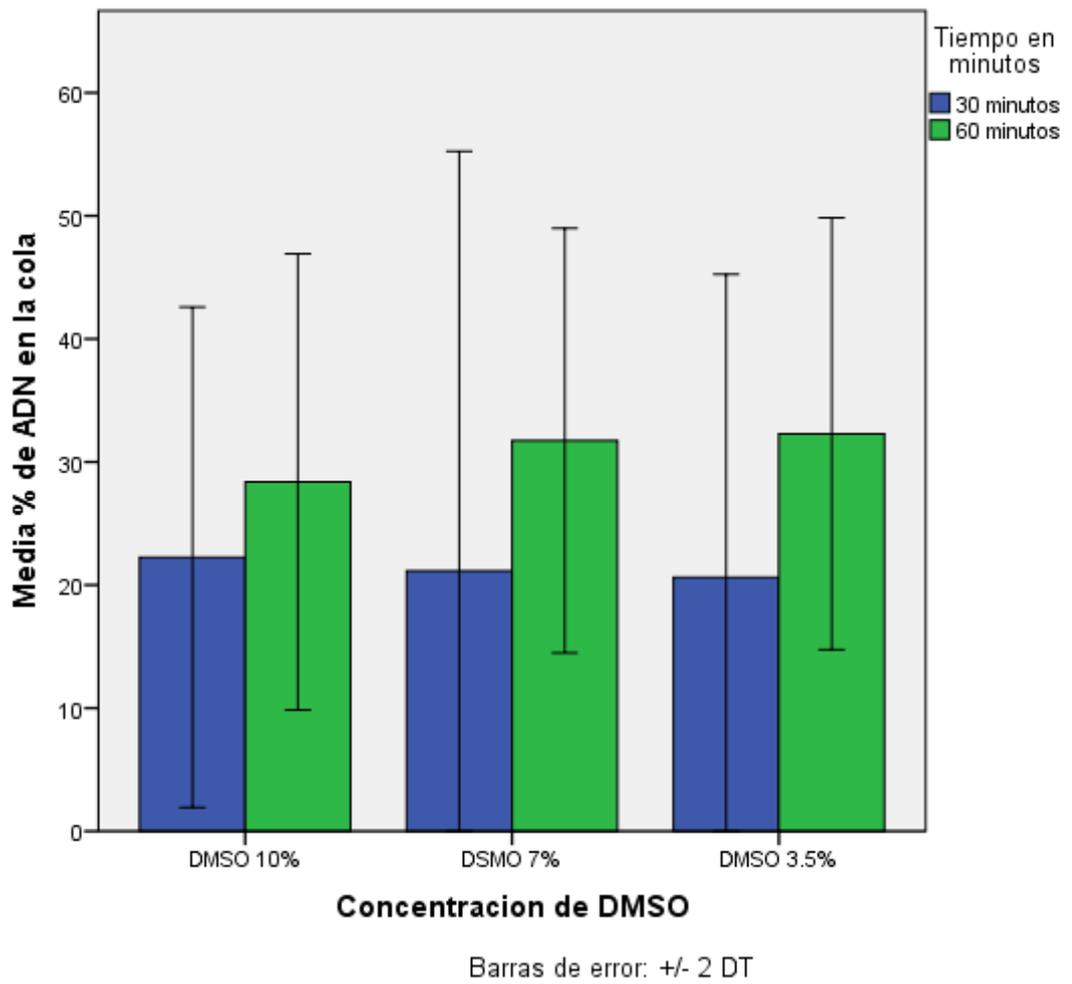


Fig. 7: Gráfico de las medias de % de ADN de cola vs la concentración de 10, 7 y 3.5% de DMSO, en 30 y 60 minutos

Se realizó ANOVA de dos vías para analizar si hay dependencia del porcentaje de ADN de cabeza y cola sobre una variables tiempo (Sig. 0.000) y concentración (Sig. 0.823) (Tabla 5 y 6), siendo el tiempo la única variable significativa en esta prueba.

**Tabla 5: Pruebas de los efectos inter-sujetos, % de cabeza y Tiempo**

Variable dependiente: % de ADN en la Cabeza

| Origen                 | Suma de cuadrados tipo III | gl  | Media cuadrática | F        | Sig. |
|------------------------|----------------------------|-----|------------------|----------|------|
| Modelo corregido       | 4323,879 <sup>a</sup>      | 5   | 864,776          | 6,618    | ,000 |
| Intersección           | 978157,862                 | 1   | 978157,862       | 7485,490 | ,000 |
| Tiempo                 | 4004,216                   | 1   | 4004,216         | 30,643   | ,000 |
| Concentracion          | 50,943                     | 2   | 25,471           | ,195     | ,823 |
| Tiempo Concentracion * | 256,922                    | 2   | 128,461          | ,983     | ,376 |
| Error                  | 22606,578                  | 173 | 130,674          |          |      |
| Total                  | 1004680,187                | 179 |                  |          |      |
| Total corregida        | 26930,457                  | 178 |                  |          |      |

a. R cuadrado = ,161 (R cuadrado corregida = ,136)

**Tabla 6: Pruebas de los efectos inter-sujetos, % ADN de cola y Tiempo**

Variable dependiente: % de ADN en la cola

| Origen                 | Suma de cuadrados tipo III | gl  | Media cuadrática | F       | Sig. |
|------------------------|----------------------------|-----|------------------|---------|------|
| Modelo corregido       | 4323,879 <sup>a</sup>      | 5   | 864,776          | 6,618   | ,000 |
| Intersección           | 121649,860                 | 1   | 121649,860       | 930,943 | ,000 |
| Tiempo                 | 4004,216                   | 1   | 4004,216         | 30,643  | ,000 |
| Concentracion          | 50,943                     | 2   | 25,471           | ,195    | ,823 |
| Tiempo Concentracion * | 256,922                    | 2   | 128,461          | ,983    | ,376 |
| Error                  | 22606,578                  | 173 | 130,674          |         |      |
| Total                  | 148798,847                 | 179 |                  |         |      |
| Total corregida        | 26930,457                  | 178 |                  |         |      |

a. R cuadrado = ,161 (R cuadrado corregida = ,136)

El DHS de Tukey mostró las diferencias entre las medias marginales de las diferentes concentraciones a las cuales se les sometió a los linfocitos. No hubo diferencias significativas entre los resultados post-incubación de las concentraciones de 10, 7 y 3.5% de DMSO. (Tabla 7 y 8)

**Tabla 7: DHS de tukey para comparar las concentraciones de 10, 7 y 3.5% de DMSO en el % de ADN de cabeza**

Variable dependiente: % de ADN en la Cabeza

| (I)Concentración de DMSO | (J)Concentración de DMSO | Diferencia de medias (I-J) | Error típ. | Sig.  | Intervalo de confianza 95% |                 |
|--------------------------|--------------------------|----------------------------|------------|-------|----------------------------|-----------------|
|                          |                          |                            |            |       | Límite inferior            | Límite superior |
| DMSO 10%                 | DSMO 7%                  | 1,0777                     | 2,0958     | ,865  | -3,8770                    | 6,0325          |
|                          | DMSO 3.5%                | 1,0884                     | 2,0958     | ,862  | -3,8663                    | 6,0432          |
| DSMO 7%                  | DMSO 10%                 | -1,0777                    | 2,0958     | ,865  | -6,0325                    | 3,8770          |
|                          | DMSO 3.5%                | ,0107                      | 2,0870     | 1,000 | -4,9232                    | 4,9446          |
| DMSO 3.5%                | DMSO 10%                 | -1,0884                    | 2,0958     | ,862  | -6,0432                    | 3,8663          |
|                          | DSMO 7%                  | -,01070                    | 2,0870     | 1,000 | -4,9446                    | 4,9232          |

Basadas en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = 130,674.

**Tabla 8: DHS de tukey para comparar las concentraciones de 10, 7 y 3.5% de DMSO en el % de ADN de cola**

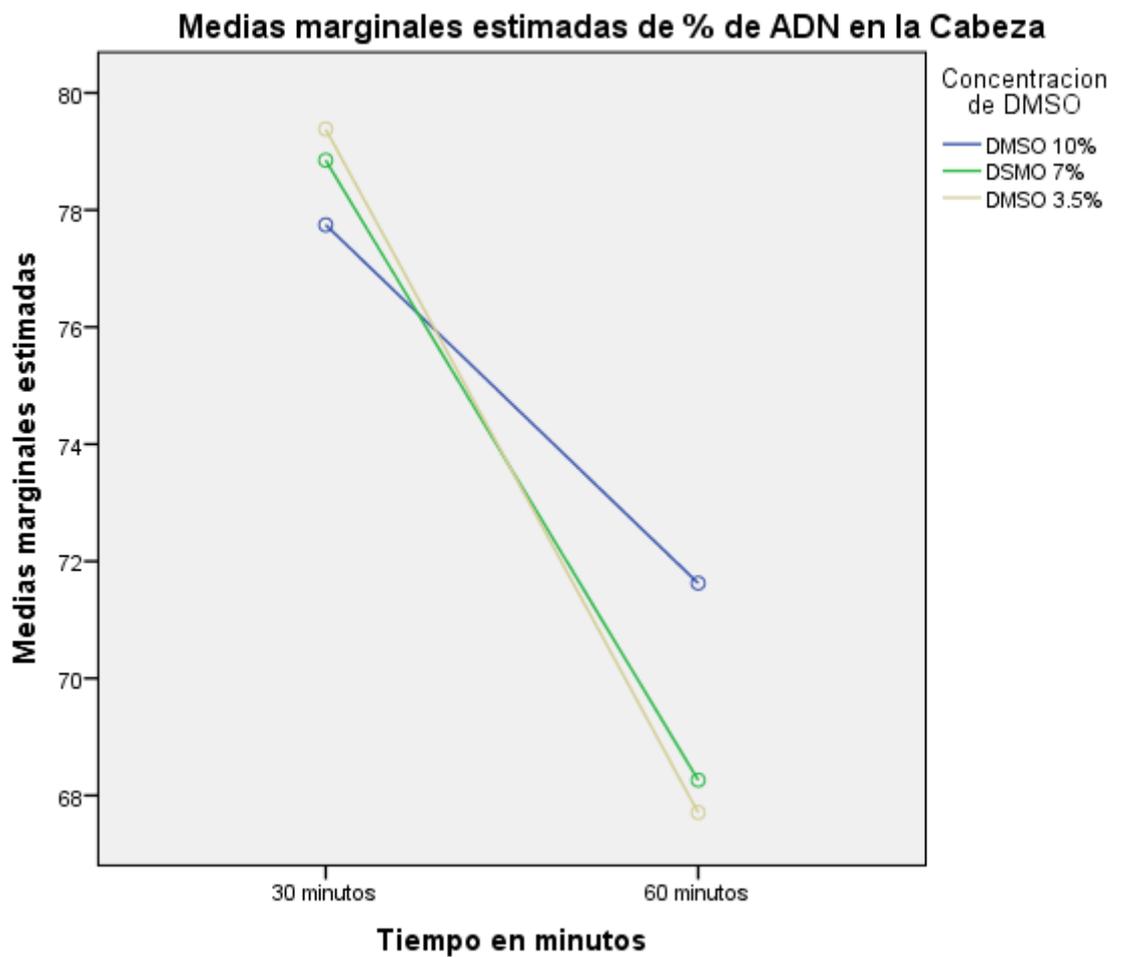
Variable dependiente: % de ADN en la cola

| (I)Concentraci on de DMSO | (J)Concentraci on de DMSO | Diferencia de medias (I-J) | Error típ. | Sig.  | Intervalo de confianza 95% |                 |
|---------------------------|---------------------------|----------------------------|------------|-------|----------------------------|-----------------|
|                           |                           |                            |            |       | Límite inferior            | Límite superior |
| DMSO 10%                  | DSMO 7%                   | -1,0777                    | 2,0958     | ,865  | -6,0325                    | 3,8770          |
|                           | DMSO 3.5%                 | -1,0884                    | 2,0958     | ,862  | -6,0432                    | 3,8663          |
| DSMO 7%                   | DMSO 10%                  | 1,0777                     | 2,0958     | ,865  | -3,8770                    | 6,0325          |
|                           | DMSO 3.5%                 | -,01070                    | 2,0870     | 1,000 | -4,9446                    | 4,9232          |
| DMSO 3.5%                 | DMSO 10%                  | 1,0884                     | 2,0958     | ,862  | -3,8663                    | 6,0432          |
|                           | DSMO 7%                   | ,0107                      | 2,0870     | 1,000 | -4,9232                    | 4,9446          |

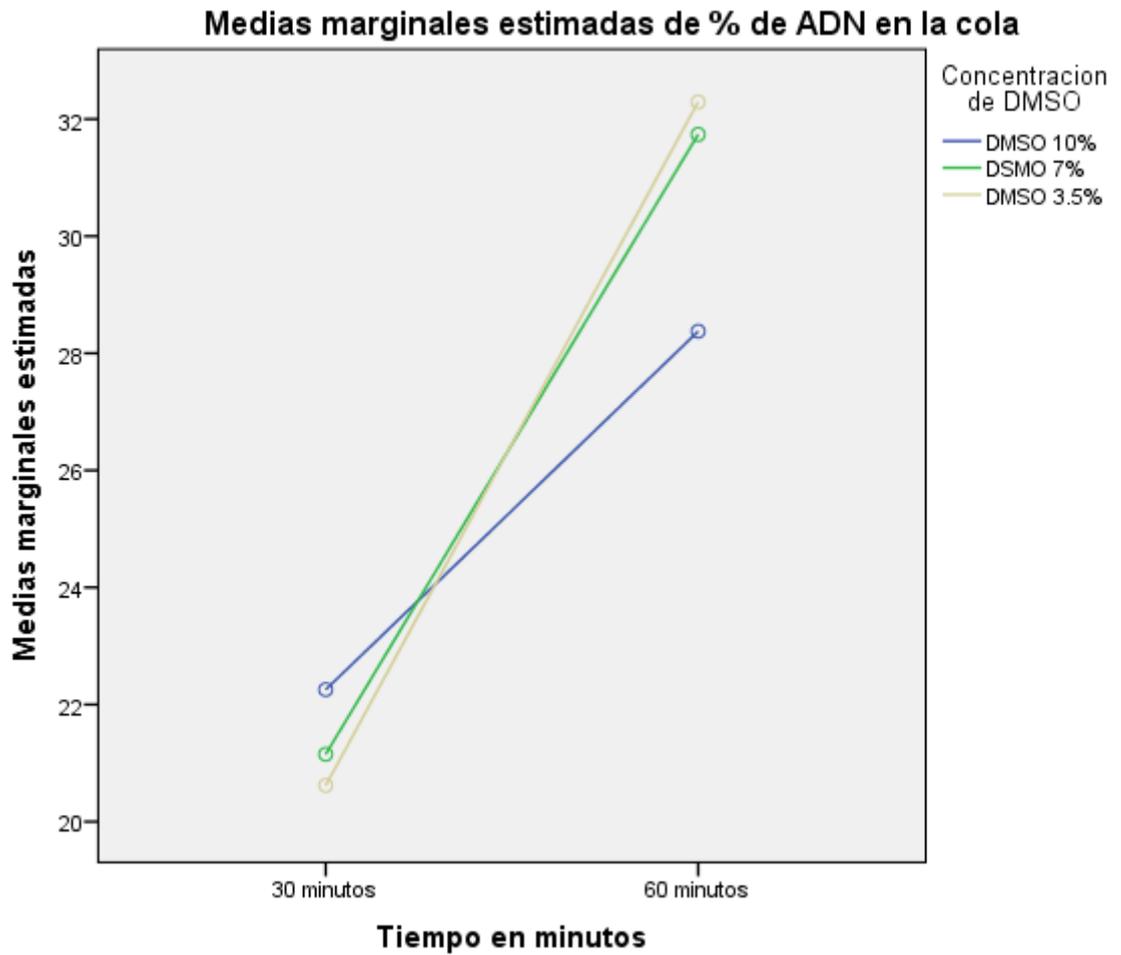
Basadas en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática(Error) = 130,674.

En un análisis de las medias marginales estimada del % de ADN de cabeza y cola se pudo observar la similitud de resultados post-incubación entre las concentraciones de 7 y 3.5% de DMSO (Grafico 8, 9), con una tendencia en todas a disminuir en % de ADN de cabeza y aumentar en % de ADN de cola, para los 30 y 60 minutos.



**Fig. 8: Tendencia de medias de % de ADN de cabeza para las concentraciones de 10, 7 y 3.5% de DMSO a 30 y 60 minutos**



**Fig. 9: Tendencia de medias de % de ADN de cola para las concentraciones de 10, 7 y 3.5% de DMSO a 30 y 60 minutos.**

Según la prueba de Dunnett los resultados son altamente significativos, es decir, los 30 y 60 minutos son estadísticamente menores que el control (ADN de cabeza) y mayor (ADN de cola), Sig. 0.000 (Tabla 9 y 10)

**Tabla 9: Comparaciones múltiples, T de Dunnett del tiempo vs el control**

Variable dependiente: % de ADN en la Cabeza

| (I) Tiempo en minutos | (J) Tiempo en minutos | Diferencia de medias (I-J) | Error típico | Sig. | Intervalo de confianza al 95% |
|-----------------------|-----------------------|----------------------------|--------------|------|-------------------------------|
|                       |                       |                            |              |      | Límite superior               |
| 30 minutos            | 0 minutos             | -13,4791*                  | 2,2500       | ,000 | -9,2650                       |
| 60 minutos            | 0 minutos             | -22,9495*                  | 2,2468       | ,000 | -18,7413                      |

\*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.

a. Las pruebas t de Dunnett tratan un grupo como control y lo comparan con todos los demás grupos.

**Tabla 10: Comparaciones múltiples, T de Dunnett del tiempo vs el control**

Variable dependiente: % de ADN en la cola

| (I) Tiempo en minutos | (J) Tiempo en minutos | Diferencia de medias (I-J) | Error típico | Sig. | Intervalo de confianza al 95% |
|-----------------------|-----------------------|----------------------------|--------------|------|-------------------------------|
|                       |                       |                            |              |      | Límite inferior               |
| 30 minutos            | 0 minutos             | 13,4791*                   | 2,2500       | ,000 | 9,2650                        |
| 60 minutos            | 0 minutos             | 22,9495*                   | 2,2468       | ,000 | 18,7413                       |

\*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.

a. Las pruebas t de Dunnett tratan un grupo como control y lo comparan con todos los demás grupos.

Se realizó un ANOVA multivariado MANOVA (Lambda de Wilks y Raíz mayor de Roy), el cual mostró que de todos los contrastes multivariados solo el factor tiempo fue significativo para la variable dependiente de ADN de cola y cabeza, es decir, es la única variable que afectó al modelo (Tabla 10 y 11).

Tabla 11: Contrastes multivariados de las variables tiempo y concentración

| Efecto                    | Valor | F                   | Gl de la hipótesis | Gl del error | Sig. |
|---------------------------|-------|---------------------|--------------------|--------------|------|
| Tiempo                    |       |                     |                    |              |      |
| Lambda de Wilks           | ,850  | 30,643 <sup>b</sup> | 1,000              | 173,000      | ,000 |
| Raíz mayor de Roy         | ,177  | 30,643 <sup>b</sup> | 1,000              | 173,000      | ,000 |
| Concentracion             |       |                     |                    |              |      |
| Lambda de Wilks           | ,998  | ,195 <sup>b</sup>   | 2,000              | 173,000      | ,823 |
| Raíz mayor de Roy         | ,002  | ,195 <sup>b</sup>   | 2,000              | 173,000      | ,823 |
| Tiempo *<br>Concentracion |       |                     |                    |              |      |
| Lambda de Wilks           | ,989  | ,983 <sup>b</sup>   | 2,000              | 173,000      | ,376 |
| Raíz mayor de Roy         | ,011  | ,983 <sup>b</sup>   | 2,000              | 173,000      | ,376 |

a. Diseño: Intersección + Tiempo + Concentración + Tiempo \* Concentración

b. Estadístico exacto

La variable concentración no afectó a las variables dependientes % de ADN de cabeza y cola.

**Tabla 12: Pruebas de los efectos inter-sujetos de las variables tiempo y concentración**

| Origen               | Variable dependiente   | Suma de cuadrados tipo III | gl | Media cuadrática | F      | Sig.              |
|----------------------|------------------------|----------------------------|----|------------------|--------|-------------------|
| Modelo corregido     | % de ADN en la Cabeza  | 4323,879 <sup>a</sup>      | 5  | 864,776          | 6,618  | ,000              |
|                      | % de ADN en la cola    | 4323,879 <sup>b</sup>      | 5  | 864,776          | 6,618  | ,000              |
| Tiempo               | % de ADN en la Cabeza  | 4004,216                   | 1  | 4004,216         | 30,643 | ,000 <sup>1</sup> |
|                      | % de ADN en la cola    | 4004,216                   | 1  | 4004,216         | 30,643 | ,000              |
| Concentracion        | % de ADN en la Cabeza  | 50,943                     | 2  | 25,471           | ,195   | ,823 <sub>2</sub> |
|                      | % de ADN en la cola    | 50,943                     | 2  | 25,471           | ,195   | ,823              |
| Tiempo Concentracion | *% de ADN en la Cabeza | 256,922                    | 2  | 128,461          | ,983   | ,376              |
|                      | % de ADN en la cola    | 256,922                    | 2  | 128,461          | ,983   | ,376              |

a. R cuadrado = ,161 (R cuadrado corregida = ,136)

b. R cuadrado = ,161 (R cuadrado corregida = ,136)

1, si afecta

2, no afecta

Los resultados descriptivos de registro visual mostraron un promedio de 42 células con bajo nivel de daño a los 30 minutos y 62 con medio nivel de daño a los 60 minutos. Por otro lado presentaron un promedio de 1 célula con alto nivel de daño a los 30 minutos y ninguna célula sin daño a los 60 minutos (Tabla 13). La tabla de contingencia del registro visual con respecto a la concentración (Tabla 14) mostró un mayor número de células sin daño en el control negativo, 21 células con nivel bajo de daño al 7% de DMSO, 36 células con medio nivel de daño a 10 y 3.5%, 8 células con alto nivel de daño a 7% de DMSO, 4 células con muy alto nivel de daño a 7 y 3.5%.

**Tabla 13: Tabla de contingencia Registro visual \* Tiempo en minutos**

|                 |                                    | Tiempo en minutos |            | Total |
|-----------------|------------------------------------|-------------------|------------|-------|
|                 |                                    | 30 minutos        | 60 minutos |       |
| Registro visual | Células sin daño                   | 6                 | 0          | 6     |
|                 | Células con bajo nivel de daño     | 42                | 10         | 52    |
|                 | Células con medio nivel de daño    | 37                | 62         | 99    |
|                 | Células con alto nivel de daño     | 1                 | 12         | 13    |
|                 | Células con muy alto nivel de daño | 4                 | 6          | 10    |
| Total           |                                    | 90                | 90         | 180   |

**Tabla 14: Tabla de contingencia Registro visual \* Concentración de DMSO**

|                 |                                    | Concentración de DMSO       |          |         |           | Total |
|-----------------|------------------------------------|-----------------------------|----------|---------|-----------|-------|
|                 |                                    | Control negativo 0% de DMSO | DMSO 10% | DMSO 7% | DMSO 3.5% |       |
| Registro visual | Células sin daño                   | 11                          | 1        | 0       | 5         | 17    |
|                 | Células con bajo nivel de daño     | 19                          | 17       | 21      | 14        | 71    |
|                 | Células con medio nivel de daño    | 0                           | 36       | 27      | 36        | 99    |
|                 | Células con alto nivel de daño     | 0                           | 4        | 8       | 1         | 13    |
|                 | Células con muy alto nivel de daño | 0                           | 2        | 4       | 4         | 10    |
| Total           |                                    | 30                          | 60       | 60      | 60        | 210   |

Se realizó una prueba de independencia de Chi cuadrado para evaluar la dependencia de los resultados con respecto a la variable concentración y tiempo. Los cuales mostraron que en ambos casos existe una dependencia, según el estadístico de Fisher (Tabla 15 y 16).

**Tabla 15: Pruebas de chi-cuadrado para la variable tiempo**

|                              | Valor               | gl | Sig. asintótica (bilateral) | Sig. exacta (bilateral) | Sig. exacta (unilateral) | Probabilidad en el punto |
|------------------------------|---------------------|----|-----------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Chi-cuadrado de Pearson      | 41,713 <sup>a</sup> | 4  | ,000                        | ,000                    |                          |                          |
| Razón de verosimilitudes     | 47,247              | 4  | ,000                        | ,000                    |                          |                          |
| Estadístico exacto de Fisher | 43,399              |    |                             | ,000                    |                          |                          |
| Asociación lineal por lineal | 27,993 <sup>b</sup> | 1  | ,000                        | ,000                    | ,000                     | ,000                     |
| N de casos válidos           | 180                 |    |                             |                         |                          |                          |

a. 2 casillas (20,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 3,00.

b. El estadístico tipificado es 5,291.

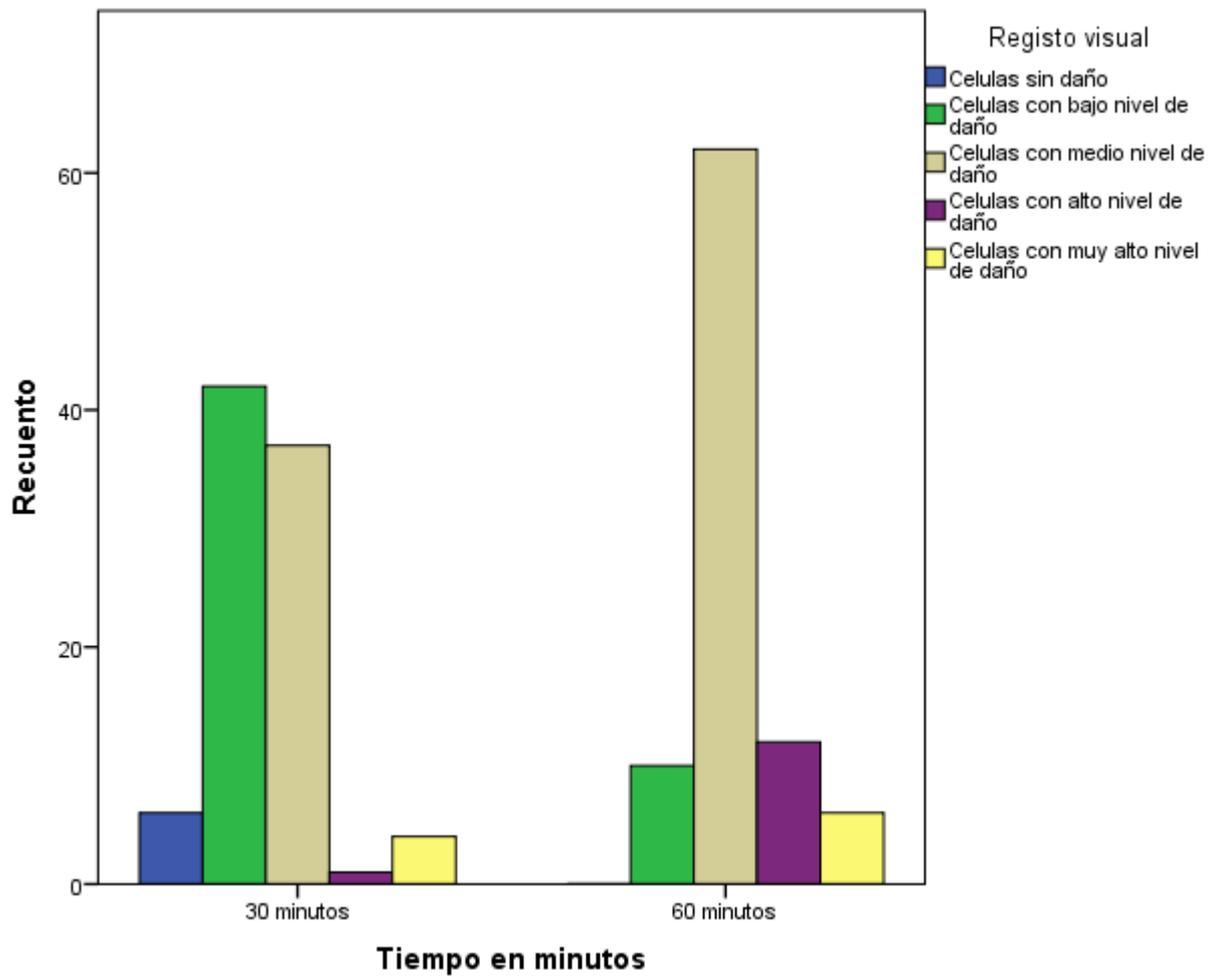
**Tabla 16: Pruebas de chi-cuadrado para la variable concentración**

|                              | Valor               | gl | Sig. asintótica (bilateral) | Sig. exacta (bilateral) | Sig. exacta (unilateral) |
|------------------------------|---------------------|----|-----------------------------|-------------------------|--------------------------|
| Chi-cuadrado de Pearson      | 78,233 <sup>a</sup> | 12 | ,000                        | . <sup>b</sup>          |                          |
| Razón de verosimilitudes     | 85,692              | 12 | ,000                        | . <sup>c</sup>          |                          |
| Estadístico exacto de Fisher | . <sup>b</sup>      |    |                             | . <sup>b</sup>          |                          |
| Asociación lineal por lineal | 27,615              | 1  | ,000                        | . <sup>b</sup>          | . <sup>b</sup>           |
| N de casos válidos           | 210                 |    |                             |                         |                          |

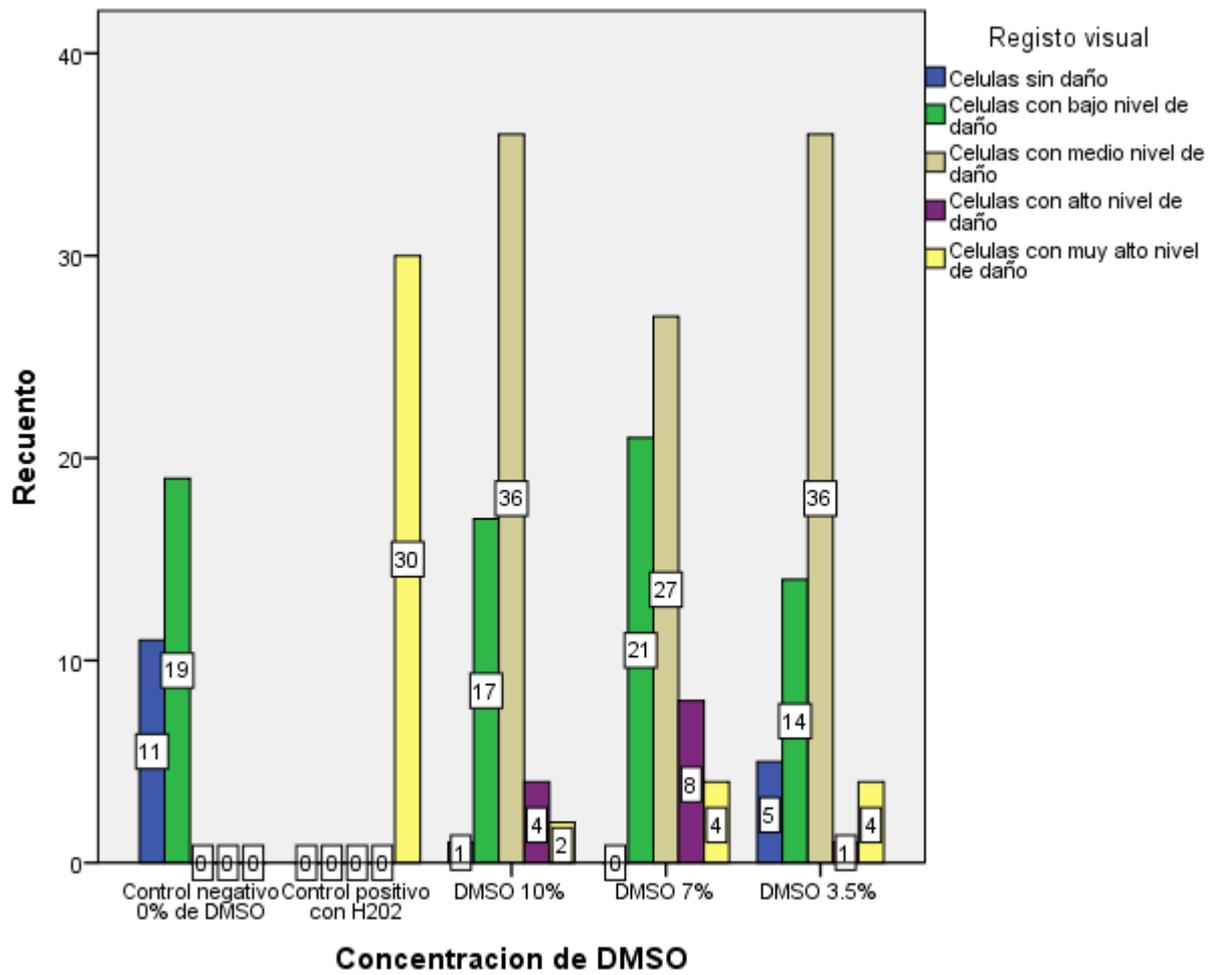
a. 12 casillas (60,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 1,43.

b. No se puede efectuar el cálculo porque no hay suficiente memoria.

c. No se puede efectuar el cálculo porque se ha excedido el tiempo límite.



**Fig. 10: Media de células según el registro visual, para los 30 y 60 minutos**



**Fig. 11: Media de células según el registro visual, para el control y 10, 7, 3.5% de DMSO.**

## VI. DISCUSION

El objetivo de esta tesis ha sido dual, por una parte profundizar los estudios del Dimetil sulfóxido (DMSO) como agente genotóxico con el ensayo cometa y, como continuación determinar la posibilidad de este ensayo para resolver cuestiones concretas tales como la adecuada concentración del DMSO a usar.

En primer lugar cabría situar al uso del DMSO en un contexto actual, visualizando su desarrollo desde una perspectiva histórica.

Desde el primer trabajo de Baxter y Lathe en 1970, evaluando los efectos bioquímicos de la toxicidad de los crioprotectores en tejido renal a altas concentraciones de Dimetil Sulfóxido, han sido muchos los investigadores del área de la toxicología y criobiología que han disertado numerosas estrategias para cubrir tal objetivo, poniendo a punto múltiples técnicas, con diferentes concentraciones y utilizando diversos tejidos.

Uno de ellos, Rubinstein et al. (Rubinstein *et al.*, 1995), criopreservó células madre de cordón umbilical con DMSO al 10%, considerado a esta la dosis mínima efectiva para la congelación de células hematopoyéticas progenitoras y al mismo tiempo la más usada a nivel comercial (Rubinstein *et al.*, 1995); la cual produce síntomas toxicológicos. Entre todas las investigaciones realizadas se pueden resaltar tres cartas al editor de la revista de Trasplantes de médula ósea (Bone Marrow Transplantation), las cuales aseguran que existe una severa toxicidad en la infusión de células autólogas criopreservadas con DMSO a los pacientes tratados (Júnior *et al.*, 2007; Abdelkefi *et al.*, 2009; Schroeder *et al.*, 2010), es decir; en un trasplante de médula ósea con el 100% de compatibilidad de HLA (Antígenos leucocitarios humanos), el receptor desarrollará trastornos neurológicos solamente a causa de una sustancia extraña que a pesar de haber tratado de ser removida por múltiples lavados, su toxicidad es tan alta, que hasta 0.5mL disuelto en 100mL de sangre podría revelar su

presencia con síntomas como palidez cutánea, pérdida de conciencia en casos simples.

Al mismo tiempo, se le atribuye al DMSO propiedades farmacológicas como anti-inflamatorio, analgésico, inhibidor del crecimiento bacteriano, diurético, inhibidor de la colinesterasa, vasodilatador, relajante muscular, potenciador farmacológico, mejora la resistencia a la infección, ayuda la diferenciación y función celular, protector contra la lesión isquémica; ya que al poseer un bajo peso molecular penetra fácilmente la membrana celular (Stanley y Robert 1986; Castaneda *et al.*, 2010; Hazen 2013).

Con esto podemos decir que aunque este compuesto ha contribuido a mejorar la calidad de vida, existen casos que lo relacionan a determinados riesgos por su toxicidad. La legislación actual exige que, previamente al registro y comercialización, se evalúe la seguridad de todo tipo de producto, por lo que resulta imprescindible utilizar ensayos de toxicidad predictivos, con el fin de anular o minimizar el uso de compuestos en los que la relación riesgo / beneficio los declare indeseables para la sociedad (Arencibia *et al.*, 2009). Al mismo tiempo ha sido necesario aclarar por Arcencibia *et al.*, (Arencibia *et al.*, 2009) esta disputa.

Es así que los resultados obtenidos nos sugieren que la exposición de células sanguíneas a agentes crioprotectores como el Dimetil sulfoxido (DMSO) no conllevaría a un daño significativo en el ADN, pues con el ensayo cometa tanto por registro visual y el software se comprobó que a exposiciones prolongadas de 30 y 60 minutos en linfocitos aislados no hubo diferencias significativas en relación a los controles ( $p < 0.05$ ). Es decir; de las tres razones fundamentales que justifican la preocupación por la exposición del hombre a los agentes mutagénicos descritas por Arcencibia *et al.* (Arencibia *et al.*, 2009), el DMSO al 10% no provocaría el aumento de la incidencia de las enfermedades genéticas en futuras generaciones, no produciría una inestabilidad genómica de células somáticas significativas con el cáncer y las enfermedades degenerativas crónicas, por último, no sería un agente etiológico causante del origen ambiental del cáncer.

Beaujea *et al.* (Beaujea *et al.*, 1998), afirmó que el uso de otras concentraciones de DMSO podrían ser igual o más eficaces durante la criopreservación, es así que desarrolló un experimento para comprobar su teoría, concluyendo exitosamente que el DMSO al 7.5% tenía igual efectividad que al 10%. La obstinación a esa concentración de DMSO se desconoce a pesar de haber estudios que comprueben que existen otras concentraciones más bajas e igual de eficaces. Halle *et al.* en el 2001 (Halle *et al.*, 2001) de la misma forma utilizó la concentración de 3.5% con otro dilutor como acompañante y demostró que es igual de efectivo. Si bien las razones se desconocen y tal vez sea una cuestión más de la marca o patente; lo que si podemos decir es, que en el presente estudio se comprobó que a pesar de tener una mayor concentración, la toxicidad fue menor que en las variables de 7 y 3.5% de DMSO. Es decir, al envolver a la concentración de 10%, la concentración extracelular fue la adecuada para dejar que solo las moléculas necesarias de DMSO ingresen, las suficientes como para protegerlas, más no dañarlas; a diferencia de las otras concentraciones que serian concentraciones aun inestables por el incremento de daño causado. Estadísticamente no se ha observado diferencias significativas entre las concentraciones de 7 y 3.5% de DMSO en el presente trabajo.

Estudios realizados por Restrepo *et al.* (Restrepo *et al.*, 2012), observaron que crioprotectores como el DMSO eran los responsables de ocasionar un estrés oxidativo, es decir, fraccionamiento del ADN en semen equino, por lo cual se puede añadir que la presente tesis refuta esa hipótesis, sugiriendo que aquel fenómeno pudo haber ocurrido por un tercer factor más no por el DMSO bruto.

El tiempo de exposición juega un rol muy importante, pues cuanto más tiempo permanezca la célula expuesta a este crioprotector, mayor será su potencial genotóxico, considerándose esta una variable significativa estadísticamente.

Considerando la clasificación química de Dimetil Sulfoxido (Baker 2014) de clase IV, ligeramente peligroso. Este tipo de químico actúa en el organismo como agente penetrante produciendo efectos tóxicos en el organismo, se le atribuye un potencial protector y minimizador de la muerte celular por apoptosis (Castaneda *et al.*, 2010), el presente trabajo aporta a la clasificación de este químico. El DMSO no es

altamente genotóxico, solo ligeramente peligroso para humanos, es decir, no produce fragmentación de ADN significativo en contacto directo.

Aunque llegar a obtener conclusiones específicas sobre el daño genotóxico causado por un tipo específico de crioprotector es muy difícil, debido a que este químico es de fácil absorción, y que las necesidades son diferentes en cada situación de la misma forma el uso; se ha podido establecer un ensayo que pueda dar un resultado el cual pueda generalizarse. Se cuenta con poca información sobre el efecto de las diferentes concentraciones del DMSO a células sanguíneas, pero ha sido comprobado que no es un agente genotóxico en humanos.

## VII. CONCLUSIONES

Después de haber realizado los análisis necesarios para evaluar nuestros datos y dar respuesta a los objetivos propuestos, y tras la discusión de los resultados obtenidos de este trabajo de tesis se pueden extraer las siguientes conclusiones:

El Dimetil Sulfoxido (DMSO) no es un agente genotóxico en linfocitos humanos incubados a diferentes concentraciones de este compuesto.

Se estableció el daño primario con el ensayo cometa, tomando como referencia el tamaño de cola para las distintas variables.

Se ha logrado demostrar que el factor concentración de DMSO, no es un factor clave para el daño genético de linfocitos.

Se ha establecido que la utilización de la concentración al 10 % a pesar de ser la concentración más alta de DMSO es eficiente en el uso con linfocitos, demostrándose también que dicho proceso no suponen un aumento significativo del daño genético inducido, ya que la media del porcentaje de ADN en cola de la incubación de linfocitos a 10% de DMSO fueron menores que las concentraciones de 7 y 3.5%.

La variable tiempo fue una de las variables determinantes presente en la evaluación con el COMET ASSAY IV y el registro visual, es decir, la variable influyó en el grado de daño al ADN de linfocitos de sangre periferia humana.

No se ha podido establecer fehacientemente el orden de daño con las concentraciones 7 y 3.5%, ya que, al analizar en conjunto, ninguno mostro tendencias a separarse.

El protocolo aquí desarrollado ha demostrado que los linfocitos humanos aislados de sangre periférica, incubados de manera prolongada, pueden ser utilizados satisfactoriamente para la determinación de los niveles endógenos de roturas en el

ADN; demostrándose también que dichos procesos no implican un aumento del daño basal o inducido.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Holmberg B, Högberg J, Johanson G. Toxicología, Principios generales de la toxicología: Definiciones y conceptos In: Silbergeld E, editor. Enciclopedia de Salud y Seguridad en el Trabajo. p. 2001. 33.3-5.
2. Epstein WW, Sweat FW. Dimethyl Sulfoxide Oxidations. Chemical Reviews. 1967 1967/06/01;67(3):247-60.
3. Baxter S, Lathe G. Biochemical effects on kidney of exposure to high concentrations of Dimethyl Sulphoxide. Biochemical Pharmacology. 1971;20:1079-91.
4. Meryman H. Cryoprotective Agents. Cryobiology. 1971;8(2):173-83.
5. Fahy G. The Relevance of Cryoprotectant "Toxicity" to Cryobiology. Cryobiology. 1986;23:1-13.
6. Stanley J, Robert H. Pharmacology of DMSO. Cryobiology. 1986;23:14-27.
7. Singh N, McCoy M, Tice R, Schneider E. A simple technique for quantitation of low levels of DNA Damage in individuals Cells. Experimental Cell Research. 1988;175(184-191).
8. Fahy G, Lilley T, Linsdell H, Douglas M, Meryman H. Cryoprotectant Toxicity and Cryoprotectant Toxicity Reduction: In Search of Molecular Mechanisms. Cryobiology. 1990;27:247-68.
9. De-Meo M, Laget M, Castegnaro M, Dumenil G. Genotoxic activity of potassium permanganate in acidic solutions. Mutat Res. 1991;260:295-306.
10. Rubinstein P, Dobrila L, Rosefield R, Adamson J, Migliaccio G, Migliaccio A, et al. Processing and cryopreservation of placental/umbilical cord blood for unrelated bone marrow reconstitution. Proc Nati Acad Sci USA. 1995;92:10119 - 22.

11. Speit G, Hartmann A. The use of the single cell gel assay (comet assay) in human biomonitoring. *Mutation Research/ Environmental Mutagenesis and Related Subjects* 3351 *Environmental Mutagenesis and Related Subjects*. 1995.
12. Hubel A. Parameters of Cell Freezing: Implications for the Cryopreservation of Stem Cells. *Transfusion Medicine Reviews*. 1997;11(3):224-33.
13. Katayama Y, Yano T, Bessho A, Deguchi S, Sunami K, Mahmut N, et al. The effects of a simplified method for cryopreservation and thawing procedures on peripheral blood stem cells. *Bone Marrow Transplantation*. 1997;19:283-7.
14. Beaujea F, Bourhis J-H, Bayle C, Jouault H, Divine M, Rieux C, et al. Successful cryopreservation of purified autologous CD341 cells: influence of freezing parameters on cell recovery and engraftment. *Bone Marrow Transplantation*. 1998;22:1091-6.
15. Galmes A, Besalduch J, Bargay J, Novo A, Morey M, Guerra J, et al. Long-term storage at -80°C of hematopoietic progenitor cells with 5-percent dimethyl sulfoxide as the sole cryoprotectant. *Transfusion*. 1999;39:70-3.
16. Roy K-M. Sulfones and Sulfoxides. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2000.
17. Halle P, Tournilhac O, Knopinska W, Kanold J, Gembara P, Boiret N, et al. Uncontrolled-rate freezing and storage at -80°C, with only 3.5-percent DMSO in cryoprotective solution for 109 autologous peripheral blood progenitor cell transplantations. *Transfusion*. 2001;41:667-73.
18. Novak K. *Drug Facts and Comparisons*. St Louis, Missouri: Wolters Kluwer Health. 2002;56:619.
19. Torradadella M. Criopreservacion Celular. *Gaceta Medica de México*. 2002;138:128-9.

20. Collins A. The Comet Assay for DNA Damage and Repair. *Molecular Biotechnology*. 2004;26:249-61.
21. Scheinkönig C, Kappicht S, Kolb HJ, Schleuning M. Adoption of long-term cultures to evaluate the cryoprotective potential of trehalose for freezing hematopoietic stem cells. *Bone Marrow Transplantation*. 2004;34(6):531-6.
22. Woods EJ, Benson JD, Agca Y, Critser JK. Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues. *Cryobiology*. 2004;48(2):146-56.
23. Monroy C, Cortés A, Sicard D, Restrepo H. Citotoxicidad y genotoxicidad en células humanas expuestas in vitro a glifosato. *Biomédica*. 2005;25:335-45.
24. Ávila L, Madero J, López C, León M, Acosta L, Gómez C, et al. Fundamentos de Criopreservación. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*. 2006;57(4):291-300.
25. Prósper F, Gavira J, Herreros J, Rábago G, Luquin R, Moreno J, et al. Trasplante celular y terapia regenerativa con células madre. *An Sist Sanit Navar*. 2006;29(2):219-34.
26. Júnior AM, Arrais CA, Saboya R, Velasques RD, Junqueira PL, Dulley FL. Neurotoxicity associated with dimethylsulfoxide-preserved hematopoietic progenitor cell infusion. *Bone Marrow Transplantation*. 2007;41(1):95-6.
27. Larrea M. Evaluación del daño genotóxico por exposición a plaguicidas en agricultores del Municipio de Luribay. Bolivia: Universidad Mayor de San Andrés; 2007.
28. Pegg D. Principles of Cryopreservation. In: Day J, Stacey G, editors. *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols*: Humana Press; 2007. p. 39-57.
29. Abrevaya X. Genotóxicos o xenobióticos. ¿Qué es la genotoxicidad? [serial on the Internet]. 2008 [Acceso 24/11 2013].

30. Dusinska M, Collins A. The comet assay in human biomonitoring: gene-environment interactions. *Mutagenesis*. 2008;23(3):191-205.
31. Abdelkefi A, Lakhal A, Moojat N, Hamed LB, Fekih J, Ladeb S, et al. Severe neurotoxicity associated with dimethyl sulphoxide following PBSCT. *Bone Marrow Transplantation*. 2009;44(5):323-4.
32. Arencibia D, Rosario L, Morffi J, Curveco D. Desarrollo y estandarización de la técnica de tres ensayos de genotoxicidad. *Revista de toxicología en línea*. 2009;25(3):22-38.
33. Arencibia D, Rosario L, Morffi J, Curveco D. Estrategias en las evaluaciones genotóxicas. *Revista de toxicología en línea*. 2009;23(3):23-40.
34. Zuñiga L. Optimizaciones metodológicas del ensayo del cometa y su aplicación en biomonitorización humana. España: Universidad Autónoma de Barcelona; 2009.
35. Castaneda J, Rivas A, Urrutia R. Efecto del DimetilSulfoxido (DMSO) sobre la apoptosis y daño renal en un model animal de isquemia-reperfusión. El Salvador: Dr. José Matías Delgado; 2010.
36. Domínguez Á. Estudio del estrés oxidativo en espermatozoides epididimarios criopreservados de ciervo (*Cervus elephus*). Mexico: Universidad de Castilla-La Mancha; 2010.
37. Schroeder T, Fenk R, Saure C, Czibere A, Bruns I, Zohren F, et al. The Mexican Way: a feasible approach to avoid DMSO toxicity. *Bone Marrow Transplantation*. 2010;46(3):469-71.
38. Jarvis W. DMSO. 2011 [cited 2014 16/03]; Available from: <http://www.ncahf.org/articles/c-d/dmso.html>.
39. Muchut S, Simoniello M, Scagnetti J, Poletta GL, Kleinsorge EC. Evaluación de genotoxicidad en linfocitos humanos expuestos a mezclas de biocidas

- mediante electroforesis en gel de células individuales (Ensayo cometa).  
Revista FABICIB. 2011;15:108-18.
40. Restrepo G, Pizarro E, Rojano B. Estrés oxidativo en el semen equino criopreservado. Revista Lasallista de Investigación. 2012;9(1):128-36.
  41. Anderson D, Dhawan A, Laubenthal J. The Comet Assay in Human Biomonitoring. In: Dhawan A, Bajpayee M, editors. Genotoxicity Assessment: Humana Press; 2013. p. 347-62.
  42. Garrido G, Morffi J, González J, Delgado R, Gómez M, Rodeiro I. Daño inducido al ADN por un extracto de la corteza de Mangifera indica mediante un ensayo Cometa in vitro. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas. 2013;12(3).
  43. Hazen KC. Influence of DMSO on antifungal activity during susceptibility testing in vitro. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. 2013;75(1):60-3.
  44. Noris-García E, Rodríguez-Rey A, Whilby-Santisteban M, Ramos-Hernández L, Robinson-Agramonte M, Pérez-Cabrera A. Niveles de plomo y daño en el ADN en niños con trastornos del espectro autista. Revista cubana de Higiene y Epidemiología. 2013;51(1):16 - 26.
  45. PAA. The cell culture company. LSM 1077, Lymphocyte Separation Medium 2013 [Acceso 3 de Diciembre de 2013]: Disponible en: [http://www.brunschwig-ch.com/pdf/downloads/PA\\_LSM\\_1077.pdf](http://www.brunschwig-ch.com/pdf/downloads/PA_LSM_1077.pdf).
  46. Baker Jk. Safety Data Sheet. Dimethyl sulfoxide [serial on the Internet]. 2014; 1.0.

## VIII. ANEXOS

### ANEXO 1

#### CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA DONACIÓN DE SANGRE PERIFÉRICA

|  |                    |                       |
|--|--------------------|-----------------------|
| Fecha                                    | Nombre del donante |                       |
| DNI                                      | Edad               | Teléfono              |
| Lugar de Recolección                     | Distrito           | Domicilio del donador |
| Persona que le informó sobre la donación | Hora               | Código de muestra     |

#### DECLARO QUE:

Declaro que: La sangre periférica extraída será solo utilizada para uso investigacional de la Bachiller en Bióloga. Marysabel C. Salas Sierralta, en su tesis titulada como “Evaluación de la genotoxicidad utilizando el ensayo cometa en linfocitos humanos expuestos a diferentes concentraciones de Dimetil Sulfoxido (DMSO)

Entiendo que la sangre periférica va a ser extraída, por punción intravenosa en las extremidades superiores, cumpliendo con todos requerimiento asépticos, sin perjuicio para mí.

Entiendo que se extraerán linfocitos de mi sangre para someterlos a incubación con la sustancia de estudio y luego para evaluación de la fragmentación del ADN.

Consiento que me extraigan una muestra de sangre (de 5ml) para aislamiento de linfocitos.

Entiendo que en caso de no ser usada la muestra de sangre para uso investigacional de la tesis ya antes mencionada, será inmediatamente desechada.

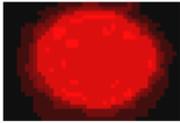
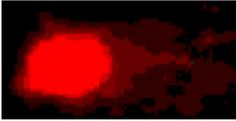
Conservo la posibilidad de renunciar a este consentimiento en cualquier momento del proyecto.

He comprendido la información recibida, he formulado todas las preguntas que he creído convenientes y me han aclarado todas las dudas planteadas, y en consecuencia, doy mi consentimiento para la donación de sangre periférica

|                      |          |
|----------------------|----------|
| Biólogo que informa: | Donante: |
|----------------------|----------|

## ANEXO 2

TABLA DE CLASIFICACIÓN DE COMETAS POR REGISTRO VISUAL

|                |  |  |
|----------------|--|--|
| <b>Clase 0</b> | <b>Células sin daño (&lt; 5%)</b>                    |    |
| <b>Clase 1</b> | <b>Células con bajo nivel de daño (5-20%)</b>        |    |
| <b>Clase 2</b> | <b>Células con medio nivel de daño (20 - 40%)</b>    |   |
| <b>Clase 3</b> | <b>Células con alto nivel de daño (40 - 95%)</b>     |  |
| <b>Clase 4</b> | <b>Células con muy alto nivel de daño (&gt; 95%)</b> |  |